



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0707607-0 A2**

(22) Data de Depósito: 08/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/37
C12M 1/34

(54) Título: **MONITORAMENTO DE MISTURAS DE ENZIMA**

(30) Prioridade Unionista: 08/02/2006 GB 06 02518.3,
08/02/2006 US 11/349,261

(73) Titular(es): Analytical Nano Technologies Limited

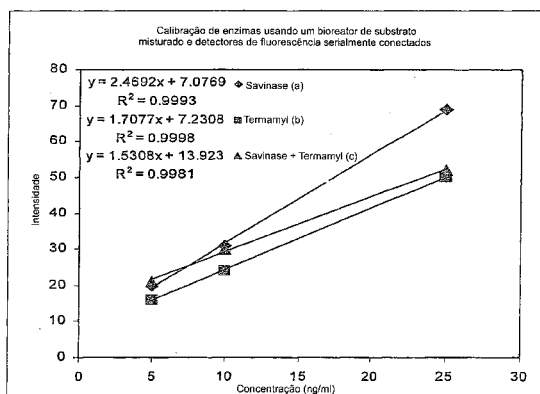
(72) Inventor(es): Frederick John Rowell, Latha Sundar

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007000430 de 08/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/091065 de 16/08/2007

(57) Resumo: MONITORAMENTO DE MISTURAS DE ENZIMA. A invenção refere-se a um método para detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de: i) fornecimento de um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, ii) fornecimento de um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, iii) exposição dos substratos rotulados à amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados para formar respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados; e detecção da presença dos referidos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MONITORAMENTO DE MISTURAS DE ENZIMA**".

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a métodos para monitoramento da
5 presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra. As enzimas podem
ser consideradas misturas de enzimas. Em modalidades da invenção, o mé-
todo compreende monitoramento de misturas enzimáticas em uma base
contínua ou quase que contínua. Os métodos da presente invenção também
10 podem ser usados para determinar a concentração de uma enzima a qual
está compreendida dentro de uma mistura de enzimas. Também incluídos
na presente divulgação são produtos e aparelhos para uso no método.

Antecedentes da Invenção

Enzimas de vários tipos são amplamente usadas por toda uma
variedade de indústrias, tais como a indústria farmacêutica, a indústria de
15 biotecnologia, a indústria de sabão e detergente e a indústria de alimentos.
Foi observado que inalação de enzimas liberadas na atmosfera do local de
trabalho podem causar efeitos prejudiciais para a saúde aos trabalhadores
expostos, resultantes de sensibilização respiratória. Limites de exposição
regulamentais foram identificados, tal como para a enzima proteolítica subti-
20 lisina e enzimas relacionadas e é um requisito obrigatório que o limite de
exposição no local de trabalho (WEL) de 40 ng/m^3 para essa classe de en-
zima seja imposto [1]. De modo a se conformar a esse requisito, é necessá-
rio monitorar a exposição em intervalos regulares ou em uma base contínua
durante períodos prolongados.

25 Sistemas para monitoramento de enzimas trazidas pelo ar con-
sistem atualmente em captura da enzima do ar, extração da enzima captu-
rada em solução e análise da solução resultante com relação às enzimas
constituintes. O método mais comum para captura consiste em passar o ar
através de um filtro e a análise é grandemente baseada em métodos espec-
30 trofotométricos ou espectrofluorescentes nos quais a enzima hidrolisa molé-
culas de substrato rotulado em solução [2] ou em um formato de imunoen-
saio, tal como ELISA [3]. A combinação de captura sobre filtros seguido por

extração complexa e análise não pode ser desenvolvida para produzir um método sensível, sem reagente e contínuo para monitoramento quase que em tempo real de enzimas trazidas pelo ar e os resultados obtidos representam valores médios com o tempo, uma vez que liberação intermitente de enzimas não pode ser monitorada.

Foi descrito um método que combina captura do ar via impacto sobre a superfície de um ciclone e análise imediata da enzima capturada da superfície lavada do ciclone. A última é obtida usando um substrato fluorescente-rotulado específico para a enzima em questão que é imobilizado sobre um suporte em fase sólida contido dentro de um leito fixo ou biorreator. Passagem da enzima através do biorreator resulta em digestão parcial do substrato e detecção dos fragmentos fluorescentemente rotulados a jusante [4]. Esse sistema permite monitoramento contínuo e quase que em tempo real de uma única enzima, a qual pode estar presente na atmosfera [5].

Até o momento, nenhum sistema foi descrito que pode monitorar simultaneamente misturas as quais compreendem pelo menos duas enzimas trazidas pelo ar em uma base contínua e quase que em tempo real. É um objetivo de modalidades da invenção proporcionar um método para monitoramento de misturas enzimáticas para uso em uma base contínua ou para monitoramento em intervalos freqüentes.

Sumário da Invenção

É um objetivo da presente invenção proporcionar um método aperfeiçoado de monitoramento de enzimas o qual é adequado para uso em uma base contínua ou para monitoramento em intervalos curtos freqüentes. Em particular, os métodos e aparelhos descritos aqui podem monitorar a presença de uma pluralidade de enzimas em uma amostra rapidamente e sem a necessidade de etapas de análise externas. Os métodos e aparelhos descritos têm aplicações em vários campos, por exemplo, o monitoramento de enzimas trazidas no ar em locais nos quais a presença de tais enzimas poderia ter um efeito prejudicial sobre a saúde do pessoal que trabalha nessa área.

O método aqui descrito permite o monitoramento qualitativo ou

quantitativo de uma amostra com relação à presença de pelo menos duas enzimas a serem analisadas.

De acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um método para a detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de:

(a) exposição de (i) um primeiro substrato para uma primeira enzima, o primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e (ii) um segundo substrato para uma segunda enzima, o segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo na amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra, se presentes, interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados para formar respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados; e

(b) detecção da presença dos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.

Em uma modalidade, o método da presente invenção é um método para detecção da presença e/ou níveis de concentração de enzimas trazidas pelo ar em um ambiente no qual as enzimas são produzidas e/ou usadas, por exemplo, um laboratório ou andar de uma fábrica.

Em um outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um recipiente para uso na detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo.

Em um outro aspecto da invenção, é proporcionado um aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção

para detecção de fragmentos de substrato fluorescentes.

Também incluído na presente invenção é o uso de um aparelho descrito aqui para a detecção de pelo menos duas enzimas em uma amostra. O uso pode ser para a detecção da presença de enzimas trazidas pelo ar. O uso também pode quantificar os níveis de pelo menos duas enzimas presentes dentro de uma amostra de ar.

Descrição Detalhada da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para a detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de:

(a) exposição de (i) um primeiro substrato para uma primeira enzima, o primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e (ii) um segundo substrato para uma segunda enzima, o segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo na amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra, se presentes, interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados para formar respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados; e

(b) detecção da presença dos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.

O presente método é para a detecção simultânea da presença de uma pluralidade de enzimas em uma amostra. Conforme usado aqui, o termo "simultânea" se refere à detecção da presença de pelo menos duas enzimas ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo, por exemplo, a detecção de pelo menos duas enzimas ocorre dentro de uma única operação do método. O método pode se referir à detecção de uma pluralidade de enzimas dentro da mesma amostra, o que não requer qualquer entrada adicional de um usuário entre a detecção da primeira enzima e a detecção da segunda enzima.

Será evidente que embora o método seja para a detecção de pelo menos duas enzimas em uma amostra, em determinadas modalidades ou determinadas ocasiões, a amostra pode conter apenas uma ou nenhuma

enzima. Contudo, o método será adequado para detecção de pelo menos duas enzimas se elas estão presentes na amostra.

O método descrito aqui refere-se, principalmente, ao monitoramento de duas enzimas. Será evidente para aqueles versados que o método da presente invenção também pode ser usado para detectar a presença e/ou quantificar os níveis de mais de duas enzimas, por exemplo, 3, 4, 5, 6 ou mais. Se o método é usado para detectar mais de duas enzimas em uma amostra, um número correspondente de substratos rotulados é proporcionado. Por exemplo, se o método é usado para detectar três tipos de enzima em uma amostra, três substratos rotulados são proporcionados, cada substrato correspondendo a uma enzima, isto é, para cada enzima a ser detectada, é proporcionado um substrato rotulado o qual interage com a mesma detectavelmente.

Em uma modalidade, o método é para a detecção da presença de pelo menos duas enzimas trazidas pelo ar.

Nessa modalidade, o método pode compreender primeira mistura de uma primeira amostra de ar com um líquido para formar uma solução a qual forma a amostra que contata os substratos. Nessa modalidade, o método pode compreender aspiração da primeira amostra de ar em um aparelho o qual coleta partículas, por exemplo, partículas de enzima, as quais são trazidas pelo ar. O método pode ainda compreender suprimento do aparelho com um líquido o qual se mistura com as partículas coletadas para produzir a solução. Em uma modalidade, o aparelho é um cone afunilado. Em uma modalidade, o método pode compreender monitoramento da taxa de fluxo de ar no aparelho e, se requerido, ajuste do fluxo de ar para assegurar que ele imita, em geral, a taxa de captação de ar quando uma pessoa inalada. Isso permite que uma comparação seja feita entre os dados obtidos abrangendo o método e a provável quantidade de enzimas trazidas pelo ar captadas por um indivíduo durante respiração normal.

Em uma modalidade, o líquido é adicionado a partir de um reservatório ao aparelho em uma base contínua. Nessa modalidade, o nível de líquido no reservatório é mantido constante através de enchimento contínuo

do mesmo. Em uma modalidade alternativa, o nível de líquido no reservatório não é mantido constantemente. Antes, o método compreende esvaziamento do reservatório e reenchimento do mesmo em uma base regular, por exemplo, após cada vez que uma primeira amostra de ar é captada ou, por exemplo, após um determinado número de amostras de ar ter sido captado, por exemplo, duas, três, quatro ou cinco ou mais amostras de ar. O reservatório pode ser esvaziado e reenchido após um ciclo do método ter ocorrido. Em uma modalidade, quando está sendo usado, o reservatório pode ser esvaziado e reenchido cerca de a cada 10 a 20 minutos, por exemplo, cerca de a cada 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais minutos.

Em uma modalidade, o método pode compreender transporte da amostra do aparelho descrito acima para uma área de reação na qual a amostra é mantida em contato com os substratos fluoróforo-rotulados. A área de reação pode compreender um recipiente de reação ou uma pluralidade de recipientes. O método compreende manter a amostra em contato com os substratos durante um tempo suficiente para permitir uma reação entre as enzimas e seus substratos correspondentes para formar um produto de reação, por exemplo, um fragmento de substrato rotulado. A produto de reação pode, então, ser detectado. Em uma modalidade, a etapa de detecção compreende o uso de um meio de detecção o qual detecta o nível de sinal emitido pelo fluoróforo preso ao fragmento de substrato. Em uma modalidade, o meio de detecção é um espectrofotômetro o qual pode, então, ser usado para determinar a presença e/ou quantidades de enzima(s) presente(s) na amostra. Em uma modalidade, o meio de detecção inclui fibras ópticas presas a cada célula de fluxo e as quais são ligadas à fontes de luz pré-sintonizadas (excitação) e múltiplos tubos multiplicadores de fótons (sistemas de detecção – pmt).

Em algumas modalidades, a amostra é contatada com os primeiro e segundo substratos durante um tempo de reação de pelo menos cerca de 1 seg, 5 seg, 10 seg, 15 seg, 20 seg, 25 seg, 30 seg, 35 seg, 40 seg, 45 seg, 50 seg, 55 seg, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min, 16 min, 17 min, 18 min,

19 min, 20 min, 21 min, 22 min, 23 min, 24 min, 25 min, 26 min, 27 min, 28 min, 29 min, 30 min, 31 min, 32 min, 33 min, 34 min, 35 min, 36 min, 37 min, 38 min, 39 min, 40 min, 41 min, 42 min, 43 min, 44 min, 45 min, 46 min, 47 min, 48 min, 49 min, 50 min, 51 min, 52 min, 53 min, 54 min, 55 min, 56 min, 57 min, 58 min, 59 min ou 60 min. De preferência, a amostra é contatada com os substratos rotulados durante um tempo de reação de pelo menos cerca de 1 minuto, pelo menos cerca de 5 minutos, pelo menos cerca de 10 minutos ou pelo menos cerca de 15 minutos.

Tipicamente, os substratos usados no presente método são selecionados dentre aqueles com os quais a enzima a ser monitorada reage/digere. Conforme usado aqui, o termo "substrato" se refere a uma substância a qual interage com uma enzima de uma forma a causar uma alteração na substância. Por exemplo, a enzima pode reagir com o substrato e/ou pode digerir o substrato em fragmentos. Os substratos usados na presente invenção são rotulados de uma forma tal a permitir a detecção da interação entre a enzima e o substrato. Em particular, o rótulo é um fluoróforo.

Em uma modalidade preferida da invenção, o substrato é uma proteína ou polipeptídeo. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados permutavelmente aqui para se referir a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos ou análogos de aminoácido e pode ser interrompido por não-aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de aminoácido que tenha sido modificado naturalmente ou através de intervenção; por exemplo, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de rotulação.

Substituições de aminoácido podem oscilar de alteração ou modificação de um ou mais aminoácidos para remodelar completamente uma região, tal como a região variável. Substituições de aminoácido são, de preferência, substituições conservativas que não afetam prejudicialmente a duplicação ou propriedades funcionais do peptídeo. Grupos de aminoácidos funcionalmente relacionados dentro dos quais substituições conservativas

podem ser feitas são glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutâmico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; e fenilalanina/tirosina/triptofano. Polipeptídeos usados na presente invenção podem estar na forma glicosilada ou não glicosilada, podem
5 ser modificados pós-traducionalmente (por exemplo, acetilação e fosforilação) ou podem ser modificados sinteticamente (por exemplo, a fixação de um grupo de rotulação).

Em uma modalidade, o primeiro substrato é selecionado do grupo consistindo em gelatina, tiroglobulina de porco, colágeno, uma imunoglobulina e albumina de soro bovino. Em uma modalidade, o segundo substrato
10 é selecionado do grupo consistindo em gelatina, tiroglobulina de porco, colágeno, uma imunoglobulina e albumina de soro bovino. Em uma modalidade, o primeiro substrato é gelatina. Os primeiro e segundo substratos podem ser os mesmos ou podem ser diferentes um do outro.

Os fluoróforos usados nos métodos da invenção para rotular os substratos são selecionados para serem detectáveis através de métodos fluorométricos normais. Além disso, os fluoróforos são particularmente escolhidos de modo que cada propriedade espectral dos fluoróforos não interfiram com os sinais fluorescentes dos outros fluoróforos co-liberados via a
15 reação de outras enzimas presentes na mistura com seus substratos específicos. De preferência, os fluoróforos selecionados não são influenciados por variações em condições ambientais, tal como o nível de pH. Em uma modalidade, os primeiro e segundo fluoróforos são independentemente selecionados do grupo consistindo em fluoresceína e seus derivados, rodamina, Texas Red®, violeta cresol e amarelo lúifer. De preferência, os fluoróforos
20 usados para rotular o primeiro substrato são diferentes do fluoróforo usado para rotular o segundo substrato.

Os substratos rotulados são, em muitos casos, vantajosamente, trazidos sobre um suporte adequado, por exemplo, embora não limitado a,
30 glóbulos de vidro, celulose fibrosa ou partículas de sol-gel. Suportes, por exemplo, suportes em fase sólida, são bem conhecidos na técnica e podem ser biológicos, não biológicos, orgânicos, inorgânicos ou uma combinação

de qualquer um desses, contanto que eles não interfiram com a reação entre os substratos rotulados e quaisquer enzimas presentes na amostra. Exemplos de suporte sólido os quais podem ser usados na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, partículas, glóbulos, fitas, precipitados, géis, folhas, tubulação, esferas, recipientes, capilares, almofadas, lâminas, filmes, placas, pedaços. O tamanho de partícula pode oscilar de 100 nm a 100 μ m de diâmetro.

Os substratos rotulados podem ser presos ao suporte através de vários meios conhecidos na técnica. Por exemplo, o substrato pode ser covalentemente preso à superfície do suporte. Em uma modalidade, o substrato pode ser ligado via absorção direta à superfície do suporte.

Em ainda uma outra modalidade preferida da invenção, o suporte compreende glóbulos que são magnetizáveis. Em uma modalidade, o suporte compreende uma pluralidade de partículas sobre as quais o(s) substrato(s) é(são) preso(s). Outros tipos de suporte sólido são conhecidos na técnica e abrangidos pela presente invenção.

Em algumas modalidades, o substrato pode não estar sobre um suporte. Por exemplo, no caso de celulose, em vista de sua insolubilidade em água, o substrato pode ser usado como partículas sólidas sem tal suporte.

O método é usado para monitorar a presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra. Exemplos de tipos de enzima os quais podem ser detectados através de aplicação dos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, membros das famílias da protease, celulase, lipase, amilase ou collagenase. Em uma modalidade, celulasas podem ser monitoradas usando colágeno rotulado como um dos substrato.

Em uma modalidade, uma das pelo menos duas enzimas é uma protease. Em uma modalidade, a protease pode ser selecionada do grupo consistindo em enzima do tipo subtilisin, tripsina, papaína, esperase e alcalase.

Em uma modalidade da invenção, o primeiro substrato é gelatina. Nessa modalidade, a primeira enzima a qual tem de ser detectada e/ou

quantificada é uma enzima do tipo subtilisin. Em uma modalidade, o segundo substrato é selecionado de amido, amilose e amilopectina. Nessa modalidade, a segunda enzima é α -amilase. Várias combinações de enzimas podem ser detectadas através dos métodos da presente divulgação.

5 Se a amostra contém enzima(s) a(s) qual(is) interage(m) com pelo menos um dos substratos, uma vez que a amostra é exposta aos substratos, uma reação entre a(s) enzima(s) presente(s) e o substrato correspondente ocorre. Em uma modalidade, reação entre a enzima e o substrato resulta em formação de fragmentos do substrato. Os fragmentos de substrato
10 rotulados liberados de cada recipiente após exposição da amostra contendo as enzimas são monitorados a jusante usando espectrofluorímetro(s) sintonizado(s) em um fluoróforo em particular ou uma pluralidade de fluoróforo. O método pode ainda compreender a etapa de sintonização do espectrofluorômetro para detectar os primeiro e segundo fluoróforos.

15 Conforme descrito acima, em uma aplicação desse método, a amostra é derivada de uma primeira amostra de ar. Uma aplicação do presente método é na área de trabalho, onde há limites regulatórios quanto à exposição dos empregados a enzimas trazidas pelo ar. Em particular, o método pode ser realizado em áreas nas quais enzimas estão sendo usadas
20 para produzir, por exemplo, pós de lavagem e gêneros alimentícios.

 O método pode ser colocado em prática de várias formas. Em uma modalidade, o método é realizado sob uma base contínua transportando a amostra continuamente a um coletor contendo uma solução. A amostra, então, contata os substratos rotulados em uma área de reação a qual contém, por exemplo, um recipiente ou uma pluralidade de recipientes.
25

 Conforme descrito acima, em uma modalidade na qual a amostra é derivada de uma primeira amostra de ar, o ar é colocado em solução. Em uma modalidade, a solução é um tampão o qual é escolhido levando-se em conta um determinado pH para passagem através do sistema. Assim, em
30 uma modalidade, a solução é um tampão aquoso. Em uma modalidade, o tampão aquoso é, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato.

 Em uma modalidade, a reprodutibilidade dos sinais de fluores-

cência é ainda intensificada através da inclusão de uma pequena quantidade de um detergente na solução. Em uma modalidade, o método compreende fornecimento de um detergente à solução. O detergente pode ser, por exemplo, Tween 20. O detergente pode ser utilizado para reduzir a ligação não-específica entre fragmentos liberados e superfícies dentro do sistema de análise de injeção de fluxo.

Em uma modalidade do método da invenção, os substratos são fornecidos dentro de um recipiente de reação, de modo que a(s) enzima(s) contida(s) dentro da amostra contata(m) simultaneamente o primeiro substrato e o segundo substrato. Por exemplo, em uma modalidade na qual os substratos são suportados sobre glóbulos, o recipiente de reação contém uma mistura heterogênea de glóbulos, alguns dos quais suportam um primeiro substrato rotulado e alguns dos quais suportam um segundo substrato rotulado. Em uma modalidade, o(s) recipiente(s) de reação(ões) é(são) uma coluna. Em uma modalidade, o(s) recipiente(s) de reação(s) pode(m) ser pequeno(s), isto é, dimensionado(s) para ser(em) facilmente transportado(s) ou instalado(s) no local a ser monitorado.

Em uma modalidade alternativa do método da invenção, as enzimas derivadas da amostra contatam seqüencialmente o primeiro substrato e o segundo substrato. Por exemplo, o recipiente de reação contém camadas homogêneas estratificadas dos diferentes substratos.

Assim, o recipiente de reação pode compreender camadas de suporte, cada camada contendo essencialmente um tipo de substrato. Como um resultado, a amostra contendo a mistura de enzimas entra em contato com uma camada, por exemplo, de primeiro substrato suportado seguido por uma camada de um segundo substrato suportado.

Alternativamente, o método compreende fornecimento de uma pluralidade de recipientes de reação em série, cada recipiente de reação contendo um único tipo de substrato rotulado. Como um resultado, a amostra contata um primeiro substrato e, então, contata um segundo substrato.

Assim, em uma modalidade, a invenção utiliza pelo menos dois recipientes de reação os quais são posicionados em série, cada um conten-

do diferentes substratos. Os recipientes podem ser ligados com um conduto para permitir que a amostra seja transportada entre os recipientes. Nessa modalidade da invenção, o primeiro recipiente pode conter o primeiro substrato e o segundo recipiente pode conter o segundo substrato. Outros recipientes de reação contendo outros substratos para outras enzimas podem ser proporcionados.

Em uma modalidade, a invenção pode compreender fornecimento de uma mistura de diferentes tipos de recipiente contatando a amostra seqüencialmente com o primeiro substrato e o segundo substrato via uma pluralidade de recipientes de reação.

Em modalidades nas quais é esperado que a amostra que está sendo analisada contenha uma protease, um dos primeiro ou segundo substratos é um substrato para a protease. Nessa modalidade, é preferível assegurar que a amostra contata os substratos seqüencialmente. Ainda mais preferivelmente, o substrato para a protease está posicionado adjacente ao meio de detecção. Descobriu-se que fragmentos do substrato de protease digerido podem aderir ao suporte, por exemplo, ao suporte em fase sólida, o qual traz o(s) outro(s) substrato(s). Assim, por exemplo, quando o método é para detecção de uma mistura de enzimas incluindo α -amilase e uma enzima do tipo subtilisin, o substrato para a enzima do tipo subtilisin é, de preferência, posicionado adjacente ao meio de detecção, isto é, a jusante com relação ao(s) outro(s) substrato(s). Assim, o recipiente de reação contendo um substrato para uma enzima protease está posicionado a jusante do(s) recipiente(s) de reação contendo substratos para outros tipos de enzimas.

A detecção do fragmento de substrato fluorescentemente rotulado pode ser realizada no local (por exemplo, em uma fábrica), se o equipamento apropriado, por exemplo, um espectrofotômetro, está disponível. Alternativamente, o recipiente de reação pode ser levado a um laboratório, onde a análise é realizada.

O método pode ainda compreender calibração dos resultados através de comparação da quantidade das pelo menos duas enzimas presentes na amostra com um padrão.

De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um recipiente para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo ro-
5 tulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo.

Em uma modalidade da invenção, os substratos rotulados são trazidos sobre um suporte adequado, conforme descrito acima. Em uma mo-
10 dalidade, o suporte é ou compreendido, por exemplo, de glóbulos de vidro, celulose, por exemplo, celulose fibrosa, sílica, por exemplo, partículas de sílica ou partículas de sol-gel. Se o suporte compreende matéria em partícula, o tamanho de partícula pode oscilar de cerca de 100 nm a cerca de 100 μ m de diâmetro.

15 Em uma modalidade da invenção, quando o suporte é, por exemplo, glóbulos de vidro ou partículas de sílica, o recipiente de reação contém uma mistura heterogênea de glóbulos ou partículas. Isto é, uma porção dos glóbulos ou partículas suporta o primeiro substrato, enquanto que uma porção dos glóbulos ou partículas suporta o segundo substrato e não há or-
20 dem discernível da disposição dos glóbulos. Em uma modalidade alternativa da invenção, o recipiente de reação contém camadas homogêneas estratificadas dos substratos.

De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas
25 em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido substrato sendo rotulado com um se-
30 gundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção para detecção de produtos de reação fluorescentes. Em uma modalidade, os primeiro e segundo fluoróforos são fluoróforos diferentes. Os fluoróforos podem ser conforme descrito aqui.

Em uma modalidade, os primeiro e segundo substratos podem formar camadas estratificadas dentro do recipiente. Em uma modalidade, um dos primeiro ou segundo substratos é um substrato para uma protease. Nessa modalidade, o recipiente compreende uma camada de substrato de protease em uma posição a qual está mais próxima de um meio de detecção do que os outros substratos. Assim, em uma modalidade, o substrato para uma enzima protease está localizado adjacente ao referido meio de detecção, isto é, a jusante dos outros substratos.

De preferência, o meio de detecção é um espectrofotômetro.

De acordo com ainda outro aspecto da invenção, é proporcionado um aparelho para a detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo, em uso, um primeiro recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, o referido primeiro aparelho sendo conectável a um segundo recipiente, em que o segundo recipiente compreende um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção para detecção de produtos de reação fluorescentes. Os produtos de reação são produzidos a partir de interação entre uma enzima e seu substrato rotulado com fluoróforo.

Em uma modalidade preferida do aparelho, o substrato no segundo recipiente é uma protease e o segundo recipiente está localizado adjacente ao meio de detecção.

Em uma modalidade, o aparelho compreende mais de dois recipientes de reação, por exemplo, três, quatro, cinco ou mais recipientes de reação. Cada recipiente de reação pode compreender um substrato rotulado com fluoróforo para uma enzima.

De preferência, o meio de detecção é um espectrofotômetro.

Por toda a descrição e reivindicações do presente relatório descritivo, as palavras "compreende" e "contém" e variações das palavras, por exemplo, "compreendendo" e "compreendem", significam "incluindo mas não

limitado a" e não se destinam (e não) excluem outras porções, aditivos, componentes, inteiros ou etapas.

Por toda a descrição e reivindicações do presente relatório descritivo, o singular abrange o plural, a menos que o contexto venha a requerer de outro modo. Em particular, onde o artigo indefinido é usado, o resultado
5 descritivo deve ser compreendida como considerando uma pluralidade, bem como uma singularidade, a menos que o contexto venha a requerer de outro modo.

Aspectos, inteiros, características, compostos, porções químicas
10 ou grupos descritos em conjunto com um aspecto, modalidade ou exemplo em particular da invenção devem ser entendidos como sendo aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo descrito aqui, a menos que incompatível com o mesmo.

Breve Descrição dos Desenhos

15 A invenção será agora descrita à guisa de exemplo apenas e com referência aos desenhos em anexo, nos quais:

Figura 1a: plotagem de calibração para a enzima protease (Savinase™) do tipo subtilisin apenas.

Figura 1b: plotagem de calibração para a enzima α -amilase
20 (Termamyl™) apenas.

Figura 1c: plotagem de calibração para α -amilase em uma mistura de equi-concentração da protease do tipo subtilisin e α -amilase.

Figura 2: Representação esquemática de um sistema de monitoramento das modalidades da presente invenção.

25 Exemplos

Exemplo 1

Um sistema é descrito o qual é capaz de monitorar concentrações trazidas pelo ar de uma variedade de enzimas trazidas pelo ar incluindo, por exemplo, enzimas do tipo subtilisin, na atmosfera do local de trabalho
30 em uma base contínua. A amostragem compreende dois estágios: usando uma cabeça de amostragem que é projetada para imitar a respiração humana a aproximadamente 1 m s^{-1} em uma taxa de amostragem de 600 l min^{-1} .

No segundo estágio, as partículas capturadas são depositadas através de impacto da corrente de ar sobre a superfície interna de um ciclone que é continuamente lavado com um jato de solução tampão. Partículas depositadas são, então, lavadas em um reservatório do qual amostras são tomadas a cada 5-6 min e injetadas automaticamente em um sistema de análise por injeção de fluxo contínuo. Enzima proteolítica na amostra passa através de um biorreator mantido em torno de 40 °C. Em uma modalidade, esse contém uma matriz em fase sólida de celulose sobre a qual está covalentemente imobilizada gelatina rotulada com Texas Red como substrato. O biorreator também pode conter um segundo substrato para uma enzima adicional. Alternativamente, um biorreator separado contendo um segundo substrato é conectado ao primeiro biorreator (não mostrado).

Em outras modalidades da invenção, o substrato pode ser imobilizado sobre partículas de sílica. A(s) enzima(s) que passa(m) digere(m) parcialmente o(s) substrato(s), liberando fluoróforo(s) que é(são) detectado(s) a jusante em uma célula de fluxo acoplada a um fluorímetro. O sistema é calibrado usando padrões de enzima e a intensidade dos picos resultantes a partir das amostras ex-ar é convertida para concentrações trazidas pelo ar usando um modelo matemático programado em um PC. O sistema tem um limite de detecção de $4,8 \text{ ng m}^{-3}$ e uma faixa dinâmica de $5\text{-}60 \text{ ng m}^{-3}$. A precisão dentro do ensaio (RSD) é de 6,3-9,6% sobre essa faixa. A precisão dentro do lote é de 20,3% a 20 ng m^{-3} e o valor entre lote correspondente é de 19,5%. O sistema foi operado durante períodos até 8 h e durante até 4 h e os valores obtidos comparados com os valores médios com o tempo obtidos a partir de um amostrador Galley e análise no-laboratório quando concordância razoável dos resultados foi observada. A estabilidade do sistema durante 21 dias de uso contínuo com padrões injetados periodicamente foi estudada. Linearidade foi observada para todas as plotagens de padrão. Ao final de 21 dias, após uma exposição total equivalente a 2395 ng ml^{-1} de Savinase, o sinal em virtude do padrão de $5,0 \text{ ng ml}^{-1}$ ainda era facilmente detectável.

Aparelho Experimental

O sistema é mostrado na Fig. 2. Ele inclui uma cabeça de amostragem compreendendo um par de placas de metal circulares (A) preso via uma tubulação de plástico a um ciclone de vidro (B). Ar é aspirado através de A e B usando um limpador a vácuo comercial (C). A taxa de fluxo de ar foi monitorada usando uma placa com orifício e ajustada conforme necessário. Uma agulha (D) foi presa a B e solução tampão foi bombeada através de seu orifício usando uma bomba peristáltica ajustável (E). À medida que o ar fluía através do ciclone, esse jato de água cobria a superfície interna do ciclone e fluía para um reservatório (F) do qual ela era reciclada via E de volta para o ciclone. O ciclone é descrito em maiores detalhes abaixo.

Após amostragem de ar, volumes conhecidos de tampão são tomados periodicamente de F em um sistema por injeção de fluxo automático (G) preso a um biorreator ou uma pluralidade de biorreatores dentro de um aquecedor de coluna termostaticamente controlado (H). A jusante está localizada uma célula de fluxo óptica (I) equipada com duas fibras ópticas presas a uma fonte de luz (J) e um espectrofotômetro (K). Solução salina tamponada com fosfato é passada através de do sistema FIA usando uma bomba peristáltica (L) e o sinal de K registrado usando um lap top PC (M). Esse PC também controlou o sistema por injeção de fluxo automático. Em ambos os casos, os programas usados foram aqueles fornecidos pelo fabricante desses dois sistemas (FIALab, Medina, WA, EUA).

Em um método alternativo, o reservatório não é enchido continuamente para manter os níveis do reservatório constantes. Antes, amostras são tomadas durante cerca de 12 minutos conforme descrito acima. A amostra é, então, analisada e o reservatório é completamente esvaziado ou reenchido. Um novo ciclo de obtenção de amostras e análise é, então, iniciado. Esse método tem a vantagem de não requerer um sistema complexo de cálculo do efeito que o reenchimento do reservatório tem sobre a concentração de enzima. Como um resultado, esse método pode ser mais simples de realizar.

O sistema por injeção de fluxo automático (G) era um modelo 3500 da FIALab Instruments. O aquecedor de coluna (H) era um aquecedor

Eppendorf CH500 (Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, Reino Unido), o qual foi ajustado para operar em uma temperatura do tampão de saída de 40 °C em uma taxa de fluxo de 0,7 ml min⁻¹. A célula de fluxo (I) era um modelo X da FIALab que também forneceu as duas fibras ópticas revestidas de aço inoxidável (P400-2), a fonte de luz de halogênio de tungstênio LS-1 e o espectrômetro S2000 (J). A bomba peristáltica (K) era um modelo P-1 da Pharmacia (Milton Keynes, Buckinghamshire, Reino Unido).

Design do ciclone

Um ciclone com dimensões de 40 mm de diâmetro, saída de 20 mm, entrada retangular de 10 mm e um corpo principal de 80 mm de comprimento e cone de 80 mm de comprimento foi construído, o qual tinha três orifícios pré-perfurados no tubo de entrada de ar para permitir até três posições da agulha para a introdução do fluido de reciclagem. Esses orifícios foram posicionados no centro do tubo de entrada e 6 mm ao lado. Uma agulha hipodérmica de aço inoxidável foi curvada em um ângulo reto (10 mm a partir da ponta) para permitir que o fluido de reciclagem fosse bombeado para o ciclone.

O ciclone foi testado para medir seu grau de eficiência carregando pó fino através da entrada do ciclone e medindo a diferença no tamanho de partícula e concentração do pó inserido no ciclone e aquela do pó que sai do ciclone usando um dimensionador de partícula aerodinâmico (APS).

Reagentes e materiais usados no sistema de análise por injeção de fluxo

A composição dos tampões, fontes de enzimas e produtos químicos e outros materiais usados no sistema de injeção de fluxo e na produção no biorreator são aqueles previamente descritos⁵⁻⁸. Gelatina do tipo B (cerca de 75 bloom) era da Sigma (Poole, Dorset, Reino Unido). Succinimidil éster Texas Red[®] era da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). As enzimas proteolíticas do tipo serina estudadas foram Purafect (Genencor International Inc., Rochester, EUA) e Savinase da Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca, que também forneceu as enzimas lipase e celulase. Papaína era da Papayer Latex e fornecida pela Sigma.

Síntese de conjugado de gelatina-Texas Red

Um dos substratos é um conjugado de gelatina-Texas Red. Gelatina (0,105 g) foi dissolvida em tampão de bicarbonato de sódio (10 ml de 0,1 M em um pH de 8,3) com ligeiro aquecimento (40 °C). Succinimidil éster Texas Red® (5 mg) foi dissolvido em 500 ml de sulfóxido de dimetila. Essa
5 mistura foi, então, adicionada à solução de gelatina dissolvida. O recipiente foi coberto com uma folha de estanho e misturado em um misturador giratório durante 1 h em temperatura ambiente. Quando armazenada a 4 °C, essa solução de gelatina rotulada é estável durante aproximadamente 3-4 semanas.

10 Síntese de fase sólida de celulose-gelatina-Texas Red

Fibra de celulose média (5 g) foi enxaguada com água desionizada e centrifugada (2000 rpm durante 6 min) antes de remoção da solução de sobrenadante. Isso foi repetido três vezes, após o que a celulose foi filtrada sob vácuo usando um funil de vidro sinterizado tamanho 2 (BDH Poole,
15 Dorset). Solução de m-periodato de sódio (80 ml de 0,5M) foi adicionada à celulose úmida e a mistura girada durante 210 min em temperatura ambiente. A celulase ativada foi, então, filtrada e lavada com 2 L de água desionizada conforme acima. A celulose ativada foi armazenada a 4 °C em água desionizada contendo 0,02% de azida de sódio e era estável durante 3-4
20 semanas.

Celulose ativada (2,5 g após filtração) foi suspensa em tampão de fosfato de sódio dibásico anídrico a 0,1 M (65 ml). A essa foi adicionada o conjugado de gelatina-Texas Red (10 ml). O recipiente foi revestido com uma folha de alumínio e girado durante 45 min em temperatura ambiente
25 antes da adição de ciano-borohidreto de sódio (250 mg). O tubo foi recolocado sobre o aparelho giratório e deixado misturar durante a noite em temperatura ambiente. Após acoplamento, a fase sólida de celulose-gelatina-Texas Red foi filtrada sob vácuo conforme acima e lavada com 2 L de água desionizada. A fase sólida de celulose-gelatina-Texas Red resultante tam-
30 bém era estável durante 3-4 semanas quando armazenada sob refrigeração em água desionizada contendo 0,02% de azida de sódio.

Desenvolvimento do sistema de análise por injeção de fluxo

Condições de FIA. O tampão de FIA e aquele para os padrões de enzima eram solução salina tamponada com fosfato (PBST). Esse continha cloreto de sódio (7,2 g), fosfato de sódio dibásico anídrico (1,48 g), monohidrato de dihidrogen ortofosfato de sódio (0,5 g), azida de sódio (0,5 g) e monolaurato de polioxietileno-sorbitan (1,0 ml) (Tween 20, ICI Americas, Inc.) por litro. A taxa de fluxo de FIA foi mantida a $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ usando pequenos ajustes da bomba peristáltica. O programa de amostragem foi compilado usando o FIALab for Windows versão 5. O volume de amostragem usado foi de 100 ml, volume total de injeção de 180 ml em uma taxa de 12 min^{-1} . Um filtro de 590 nm foi inserido no trajeto da fonte de luz (J) e o espectrofotômetro (K) foi ajustado a 612 nm.

Resultados

Design do sistema de amostragem de ar

Testagem do design do ciclone e seu desempenho. O ciclone foi testado através de uma faixa de fluxos de ar (nove diferentes fluxos de ar de 175 a 732 l min^{-1}) e foi mostrado que, a 608 l min^{-1} , havia uma d_{50} de aproximadamente 0,77 mm, com um SD de 1,1%. Pode ser observado que o ciclone captura eficazmente pelo menos 90% das partículas de 1,5 mm e acima em um fluxo de ar de 600 l min^{-1} . Isso estabelece que o ciclone é capaz de capturar os tamanhos de partícula conforme requerido pelo projeto e de um tamanho similar aos filtros usados em amostradores Galley os quais têm um tamanho de poro de 1,2 mm.

O design do ciclone foi conectado a um sistema de entrada de amostragem de ar. Esse é projetado para imitar a respiração humana quando operando em uma taxa de amostragem de cerca de 600 l min^{-1} e em um fluxo de entrada de cerca de 1 ms^{-1} .

Com o sistema analítico, um novo substrato foi usado para produzir os sinais requeridos para uma das enzimas. Gelatina foi conjugada com Texas Red® para produzir um rótulo fluorescente que foi, então, covalentemente imobilizado sobre uma matriz de suporte de celulose. Gelatina foi escolhida como um dos substratos da invenção porque ela proporciona muitos sítios para conjugação fluorescente e hidrólise potencial da enzima.

Quando de exposição a enzimas protease do tipo subtilisin, clivagem proteolítica da gelatina imobilizada ocorreu, resultando em sinais fluorescentes que foram registrados pelo espectrofotômetro. Outros substratos também são utilizados no presente método.

5 O aparelho descrito acima constitui um sistema quase que em tempo real para determinação da concentração trazida pelo ar, por exemplo, de enzimas na indústria. O tampão escolhido é adequado para manutenção da atividade de protease da enzima e do sinal do fluoróforo. Seu uso também minimiza a lixívia de fluoróforos, assim, prolongando a vida útil do bior-
10 reator (dados não mostrados).

O sistema tem boa precisão de ensaio e variabilidade entre e dentre lote razoável. A variação se origina principalmente de empacotamento inconsistente das colunas durante fabricação dos biorreatores. Isso é atualmente realizado manualmente, mas um sistema automático provavelmente
15 levaria a uma consistência de lote muito melhor.

O sistema é relativamente portátil e foi demonstrado obter sucesso durante períodos prolongados. O sistema também proporciona um registro quase contínuo de concentrações trazidas no ar de enzimas por todo o período de amostragem. O sistema é um sistema em tempo real, com
20 respostas de 5 min e uma capacidade para monitoramento contínuo durante períodos de 8 h sob condições industriais.

Exemplo 2

Em uma modalidade alternativa, o método utiliza um suporte diferente para os substratos.

25 Partículas de sol-gel ativadas com glicidóxi propiltrimetóxi silano foram tratadas com gelatina pré-rotulada com Texas Red® para produzir um suporte em fase sólida revestido-substrato em fase sólida para proteases do tipo subtilisin (por exemplo, Savinase™).

Outras partículas de sol-gel com aminopropil trimetóxi silano foram tratadas com amido rotulado com etileno diâmina de fluoresceína para
30 produzir um substrato em fase sólida para α -amilase (por exemplo, Termamyl™).

Massas iguais dos reagentes em fase sólida foram colocadas em camadas e, então, empacotadas em uma mini-coluna, de modo que a camada inferior consistia das partículas revestidas com o substrato para a enzima do tipo subtilisin e a camada superior consistia das partículas revestidas com o substrato para α -amilase. A mini-coluna foi alimentada, em uma taxa de fluxo de 0,7 ml/min, com amostras contendo 5 a 25 ng/ml de misturas de savinase e amilase ou o componente enzimático individual, em solução salina tamponada com fosfato (pH de 7,4) com Tween 20 (0,1%). As amostras foram obtidas usando o ciclone descrito acima. A mini-coluna foi ligada a jusante a dois espectrofluorímetros conectados em série, o primeiro ajustado na fluorescência de fluoresceína (excitação de 490 nm, emissão de 535 nm) e o segundo na fluorescência do Texas Red® (excitação de 590 nm, emissão de 620 nm) e as intensidades de fluorescência dos dois fluoróforos simultânea e continuamente monitorados. Um tempo de resposta de 2 minutos foi observado para cada enzima com repetições de amostra possíveis a cada 5 minutos. Curvas padrões de concentração/sinal linear foram obtidas para as enzimas unicamente (figura 1a, protease apenas; figura 1b, amilase apenas) e para a mistura das duas enzimas sobre essa faixa de concentração (figura 1c, resposta para amilase mostrada) quando injetada na coluna.

Exemplo 3

Preparo de substratos fluorescentes para uso em empacotamento de biorreatores para alfa-amilase

Preparo da etileno diamina fluoresceína-rotulada (EDA-FITC)

O material usado foi Isômero I de Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Sigma (F-7250), N,N-Dimetilformamida (DMF), Aldrich (31.993-7), 1,4 Dioxano, Aldrich (27.053-9) e Etileno diamina, Aldrich (E 2,626-6).

Tomar uma garrafa de vidro de 50 ml seca, limpa e pesar precisamente 39 mg de FITC. Dissolver FITC através da adição de 200 μ l de DM. Adicionar 4,8 ml de 1,4 Dioxano à solução de FITC. Adicionar 6,68 μ l de Etileno diamina ao FITC. Agitar a solução de EDA-FITC durante 1 h sobre um agitador magnético em temperatura ambiente mantendo coberto com uma

folha de alumínio. Um precipitado de cor laranja escuro será formado.

- Após agitação de 1 h, remover a garrafa e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante em solvente residual e adicionar 5 ml de 1,4 dioxano, submeter a turbilhonamento e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante em solvente residual e transferir o precipitado para um frasco de fundo redondo usando uma quantidade mínima de 1,4 dioxano. Evaporar o solvente através de evaporação giratória a 50 °C durante aproximadamente 3 horas. Uma vez que o precipitado está seco, pesá-lo e transferir para um frasco de vidro seco, limpo e armazenar em um secador a 4 °C, assegurando de cobri-lo com uma folha.

Ativação de etileno diamina rotulada (EDA-FITC)

- Os materiais requeridos são cloreto cianúrico, Aldrich (C 9.550-1), etileno diamina rotulada (EDA-FITC) (veja ref 1 acima), N,N-Dimetilformamida (DMF), Aldrich (31.993-7), Trietilamina, Fluka (90340) e solução salina tamponada com fosfato com azida, pH de 7,4 (PBS com azida) (veja SOP-Buffers 003).

- Preparar 4,3 ml de solução de EDA-FITC a 10 mg/ml pesando 43 mg de EDA-FITC conforme preparado em 1 em uma garrafa de vidro seca, limpa e dissolver o mesmo em 4,3 ml de DMF. Pesar 21,5 mg de cloreto cianúrico e adicionada à solução de EDA-FITC. Adicionar 20 ml de solução de trietilamina a 1 mg/ml preparada através da adição de 27,5 µl de trietilamina em 20 ml de PBS com azida à solução de EDA-FITC ativada. Submeter a mistura a turbilhonamento para assegurar mistura completa. Um precipitado se formará. Armazenar o precipitado no escuro a 4 °C.

- Acoplamento de etileno diamina rotulada ativada (ACT-EDA-FITC) a substrato de amido (amilopectina e amilose também podem ser usadas)

- Os materiais requeridos são: amido solúvel, Sigma (S-9765), solução salina tamponada com fosfato com azida, pH de 7,4 (PBS com azida), EDA-FITC ativada (veja acima) e carbonato de sódio, Sigma (S-7795).
- Preparo de solução de carbonato de sódio a 0,5 M:

Pesar 5,495 g de carbonato de sódio em um frasco volumétrico de 100 ml e dissolver usando uma quantidade mínima de água desionizada.

Uma vez dissolvido, compor até a marca.

Acoplamento de Act-EDA-FITC ao substrato de amido

Pesar 0,5 g de amido solúvel em uma garrafa de vidro seca, limpa de 25 ml. Adicionar 15 ml de PBS ao amido e aquecer em um banho de água mantendo aproximadamente 60 - 70 °C com agitação contínua até que
5 uma suspensão transparente seja formada. Uma suspensão transparente com consistência de geléia será formada.

À suspensão de amido, adicionar 2 ml de EDA-FITC ativada (Ref 2 acima) e submeter a turbilhonamento para proporcionar uma suspensão
10 uniforme. Colocar de volta no banho de água e continuar o aquecimento (~60-70 °C) através de agitação contínua no escuro. Após 10 minutos, adicionar 200 µl de solução de carbonato de sódio a 0,5M e continuar a agitar a 70 °C durante 1 hora no escuro. Remover a suspensão do banho de água quente após uma hora e esfriar para a temperatura ambiente colocando em
15 uma câmara com coifa.

Uma vez esfriada, transferir a suspensão para um tubo de diálise e submeter à diálise contra água desionizada mantendo a 37 °C. Continuar a diálise até que mais nenhuma fluorescência seja observada na água desionizada. Isso levará aproximadamente três a quatro dias. Uma vez submetida
20 à diálise, transferir a suspensão para um tubo Sterilin de 30 ml e armazenar na geladeira enrolando em uma folha.

Preparo de partículas de gel de sílica, sílica ou sol-gel revestidas com aminopropil trietóxi-silano (APTES)

Os materiais requeridos são partículas de sol-gel, aminopropil trietóxi-silano (APTES), Sigma (A3648) e solução salina tamponada com fosfato, pH de 7,2 (PBS com azida).
25

Pesar aproximadamente 10 g de partículas de sol-gel secas (125-180 µm) em um tubo Sterilin de 50 ml. Adicionar 20 ml de PBS e submeter as partículas a turbilhonamento. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante e adicionar 2 ml de APTES e girar durante
30 2 horas em um aparelho giratório. Remover do aparelho giratório e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante em solvente

residual e adicionar 20 ml de PBS e submeter a turbilhonamento durante 30 seg e girar durante 5 minutos. Repetir as lavagens mais 3 vezes seguindo as etapas 5 e 6, isto é, remover do aparelho giratório e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante em solvente residual e adicionar 20 ml de PBS e submeter a turbilhonamento durante 30 seg e girar durante 5 minutos. As partículas revestidas com APTES estão prontas para uso. Para armazenamento, suspender as partículas em uma quantidade mínima de PBS e armazenar a 4°C.

10 Imobilização de amido-EDA-FITC à partículas de sol-gel e sílica similares revestidas com APTES

Os materiais requeridos são partículas de sol-gel revestidas com APTES (veja acima), solução salina tamponada com fosfato, pH de 7,2 (PBS com azida) e amido-EDA-FITC (veja acima).

15 Pesar cerca de 5 g de peso úmido de partículas de sol-gel revestidas com APTES (125-180 μm) em um tubo plástico Sterilin de 30 ml. Adicionar 20 ml de PBS-azida e submeter as partículas a turbilhonamento. Adicionar 5 ml de substrato amido-EDA-FITC e girar durante a noite. Remover do aparelho giratório e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Descartar o sobrenadante em solvente residual e adicionar 20 ml de PBS e submeter a 20 turbilhonamento durante 30 seg e girar durante 5 minutos. Repetir as lavagens mais 3 vezes seguindo as etapas de remoção do aparelho giratório e centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos e, então, descartar o sobrenadante em solvente residual e adicionar 20 ml de PBS e submeter a turbilhonamento durante 30 seg e girar durante 5 minutos. O substrato de amido imobilizado sobre partículas de sol-gel está pronto para empacotamento. 25

Armazenar as partículas de amido imobilizadas em uma quantidade mínima de PBS-azida a 4 °C e usar dentro de 3 dias de preparo. Empacotar cerca de 0,8 g de partículas derivatizadas úmidas em colunas conforme descrito para gelatina-celulose acima e condições conforme para as 30 colunas no biorreator de protease.

Referências

1. EH40/2005 Workplace exposure limits, Environmental Hygiene

ne Guidance Note EH40, HSE Books, ISBN 0717629775

2. Rothgeb, T.M., Goodlander, B.D., Garrison, P.H. & Smith, L.A., *J. Am. Oil Chemists Soc*, 65, 806 (1988)

3. Miao, Z-H, Rowell, F.J., Reeve, R.N., Cumming, R.H., *Journal of Environmental Monitoring*, 2, 451-454 (2000)

4. Monitoring of Enzymes, PCT/GB96/03052

5. Tang, LX., Rowell, F.J., Cumming, R.H., *Annals Occupational Hygiene*, 40, 381- 389 (1996)

6. D. Sykes e colaboradores, *J. Aerosol Sci.*, 2000, 31, S90-91

10 7. LX. Tang e colaboradores, *Analyst*, 1995, 120, 1949

8. Tang, LX., Rowell, F.J., Cumming, R.H., *Anal. Proc. Incl. Anal. Comm.* 1995, 32 519

Também incluídos na presente descrição estão o assunto em questão dos seguintes parágrafos:

15 1. Um método para detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de: fornecimento de um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, fornecimento de um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, exposição dos substratos rotulados à amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados formem respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados; detecção da presença dos referidos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.

2. Um método de acordo com o parágrafo 1, em que o primeiro e/ou segundo substrato é uma proteína ou polipeptídeo.

3. Um método de acordo com o parágrafo 2, em que a proteína ou polipeptídeo é selecionado do grupo de: gelatina, tiroglobulina de porco, colágeno, imunoglobulina ou albumina de soro bovino.

4. Um método de acordo com qualquer parágrafo precedente, em que pelo menos um dos substratos é trazido sobre um suporte.

5. Um método de acordo com o parágrafo 4, em que o suporte é um suporte em fase sólida compreendendo: glóbulos de vidro ou sol-gel ou fibras de celulose.

6. Um método de acordo com o parágrafo 4 ou 5, em que os glóbulos são magnetizáveis.

7. Um método de acordo com o parágrafo precedente em que as primeira e segunda enzimas são selecionadas do grupo de enzima consistindo em: protease, celulase, lipase, D-amilase ou collagenase.

8. Um método de acordo com o parágrafo 7, em que a protease é selecionada do grupo consistindo em: tipo subtilisin, tripsina, papaína, esperase ou alcalase.

9. Um método de acordo com qualquer parágrafo precedente em que o primeiro e segundo fluoróforo são fluoresceína, rodamina, Texas Red® ou amarelo lúcer.

10. Um método de acordo com qualquer parágrafo precedente em que a amostra é ar.

11. Um método de acordo com qualquer parágrafo precedente em que a(s) enzima(s) derivada(s) da amostra contata(m) simultaneamente o primeiro substrato e o segundo substrato.

12. Um método de acordo com qualquer parágrafo precedente em que a(s) enzima(s) derivada da amostra contata(m) seqüencialmente o primeiro substrato e o segundo substrato.

13. Um método de acordo com o parágrafo 11 ou 12, em que o segundo substrato é um substrato para uma protease.

14. Um recipiente para uso na detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo.

15. Um recipiente de acordo com o parágrafo 14, em que pelo menos um dos substratos é trazido sobre um suporte sólido.

16. Um recipiente de acordo com o parágrafo 15, em que o suporte é um suporte em fase sólida compreendendo: glóbulos de vidro ou sol-gel ou fibras de celulose.

17. Um recipiente de acordo com o parágrafo 16, em que o recipiente contém uma mistura heterogênea dos primeiro e segundo substratos.

18. Um recipiente de acordo com o parágrafo 16, em que o recipiente contém uma camada do primeiro substrato e uma camada do segundo substrato.

19. Aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção para detecção de fragmentos de substrato fluorescentes.

20. Aparelho de acordo com o parágrafo 19, em que os primeiro e segundo substratos estão em camadas dentro do recipiente e a camada do segundo substrato, sendo um substrato para uma protease, está localizada adjacente ao referido meio de detecção.

21. Aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um primeiro recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, o referido primeiro aparelho sendo conectável a um segundo recipiente, em que o segundo recipiente compreende um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho compreendendo ainda meios de detecção para detecção de fragmentos de substrato fluorescentes.

22. Aparelho de acordo com o parágrafo 21, em que o substrato no segundo recipiente é uma protease e o segundo recipiente está localizado adjacente ao meio de detecção.

23. Um método, recipiente ou aparelho conforme substancialmente aqui descrito com referência ao exemplo em anexo e Figura 1.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção simultânea da presença ou ausência de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de:

5 (i) exposição de (a) um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e (b) um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo à amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra, se pre-

10 sentes, interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados para formar respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados;

 (ii) detecção da presença dos referidos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.

15 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o método é para a detecção dos níveis de pelo menos duas enzimas trazidas no ar e o qual compreende as seguintes etapas:

 (i) antes de exposição dos substratos à amostra, obtenção de uma primeira amostra de ar atmosférico; e

20 (ii) captura de quaisquer partículas enzimáticas as quais estão presentes na primeira amostra.

 3. Método de acordo com a reivindicação 2, ainda compreendendo mistura das partículas de enzima capturadas com um líquido para formar a amostra.

25 4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o líquido é um tampão aquoso.

 5. Método de acordo com a reivindicação 4, ainda compreendendo transporte da amostra de uma área na qual a primeira amostra é misturada com o líquido para uma área de reação na qual a amostra é exposta

30 aos substratos.

 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que a etapa de exposição da amostra aos substratos é realiza-

da durante um período de tempo suficiente para permitir interação entre as primeira e/ou segunda enzima com o respectivo substrato para formar um fragmento de substrato fluoróforo-rotulado.

5 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a etapa de detecção envolve detecção de um sinal emitido pelo primeiro e/ou segundo fragmento de substrato fluoróforo-rotulado.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o primeiro e/ou segundo substrato é uma proteína ou polipeptídeo.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a proteína ou polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em gelatina, tiroglobulina suína, colágeno, uma imunoglobulina ou fragmento da mesma e albumina de soro bovino.

15 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que pelo menos um dos substratos é carregado sobre um suporte.

11. Método de acordo com a reivindicação 10 em que o suporte é um suporte de fase sólida.

20 12. Método de acordo com a reivindicação 10 ou a reivindicação 11, em que o suporte é produzido a partir de ou compreende vidro, glóbulos de sol gel, fibras de celulose ou partículas de sílica.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12 em que o suporte é magnetizável.

25 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que a primeira e/ou segunda enzima é selecionada do grupo de enzimas consistindo em protease, celulase, lipase, α -amilase ou colagenase.

30 15. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a protease é selecionada do grupo consistindo no tipo subtilisin, tripsina, papaína, esperase e alcalase.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o primeiro e/ou o segundo fluoróforo é selecionado de

fluoresceína e derivados da mesma, rodamina, Texas Red® e amarelo lúci-fer.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que a amostra é derivada de uma primeira amostra de ar.

5 18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 17, em que um ou ambos dos primeiro e segundo substrato são um substrato para uma protease.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, o qual compreende primeiro exposição da amostra a um dos
10 primeiro ou segundo substratos e subsequente exposição da amostra ao outro dos primeiro ou segundo substratos.

20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, em que pelo menos uma das enzimas que está sendo monitorada é uma protease e pelo menos um dos primeiro e segundo substratos é um substrato para pro-
15 tease.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que a enzima é uma enzima do tipo subtilisin e o substrato é α -amilase.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, o qual compreende exposição da amostra ao primeiro substrato e ao se-
20 gundo substrato ao mesmo tempo.

23. Recipiente para uso na detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido recipiente compreendendo, em uso, um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo
25 substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo.

24. Recipiente de acordo com a reivindicação 23, o qual compreende um suporte sobre o qual pelo menos um dos primeiro e segundo substratos é suportado.

30 25. Recipiente de acordo com a reivindicação 23 ou a reivindicação 24, em que o suporte é um suporte de fase sólida compreendendo vidro ou glóbulos de sol gel, partículas de sílica ou fibras de celulose.

26. Recipiente de acordo com a reivindicação 25, em que o recipiente contém uma mistura heterogênea do primeiro substrato e do segundo substrato.

5 27. Recipiente de acordo com a reivindicação 26, em que o recipiente contém pelo menos uma camada a qual é substancialmente composta do primeiro substrato e pelo menos uma camada a qual é substancialmente composta do segundo substrato.

28. Aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo e um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção para detecção de fragmentos de substrato fluorescente.
15

29. Aparelho de acordo com a reivindicação 28, em que os primeiro e segundo substratos estão em camadas dentro do recipiente.

30. Aparelho de acordo com a reivindicação 29, em que quando um dos primeiro substrato e segundo substrato é um substrato para uma enzima protease, ele está posicionado de modo a estar a jusante dos outros substratos.
20

31. Aparelho para uso na detecção simultânea de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido aparelho compreendendo um primeiro recipiente compreendendo um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, o referido primeiro aparelho sendo conectável a um segundo recipiente, em que o segundo recipiente compreende um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, o referido aparelho ainda compreendendo meios de detecção para detecção de fragmentos de substrato fluorescente.
25
30

32. Aparelho de acordo com a reivindicação 31 em que, quando um dos primeiro substrato ou segundo substrato é um substrato para uma

enzima protease, ele está situado no recipiente a jusante do outro recipiente e está localizado adjacente ao meio de detecção.

Fig.1

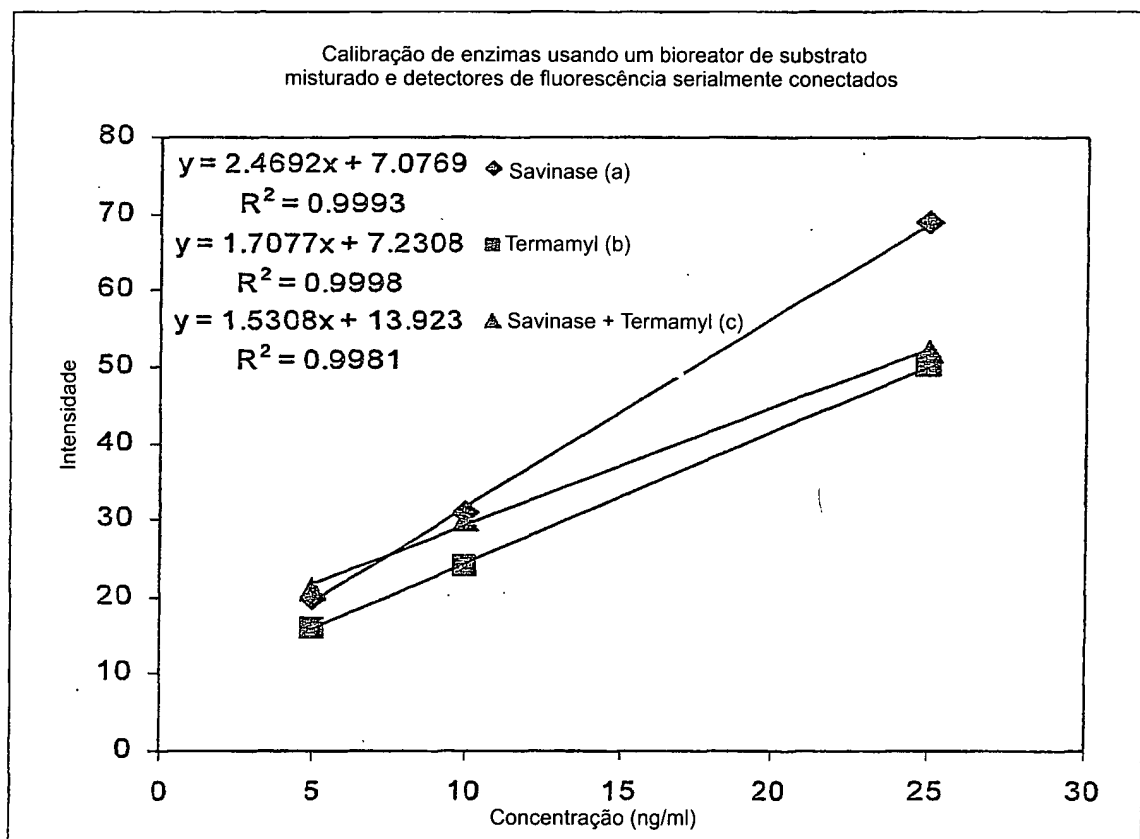
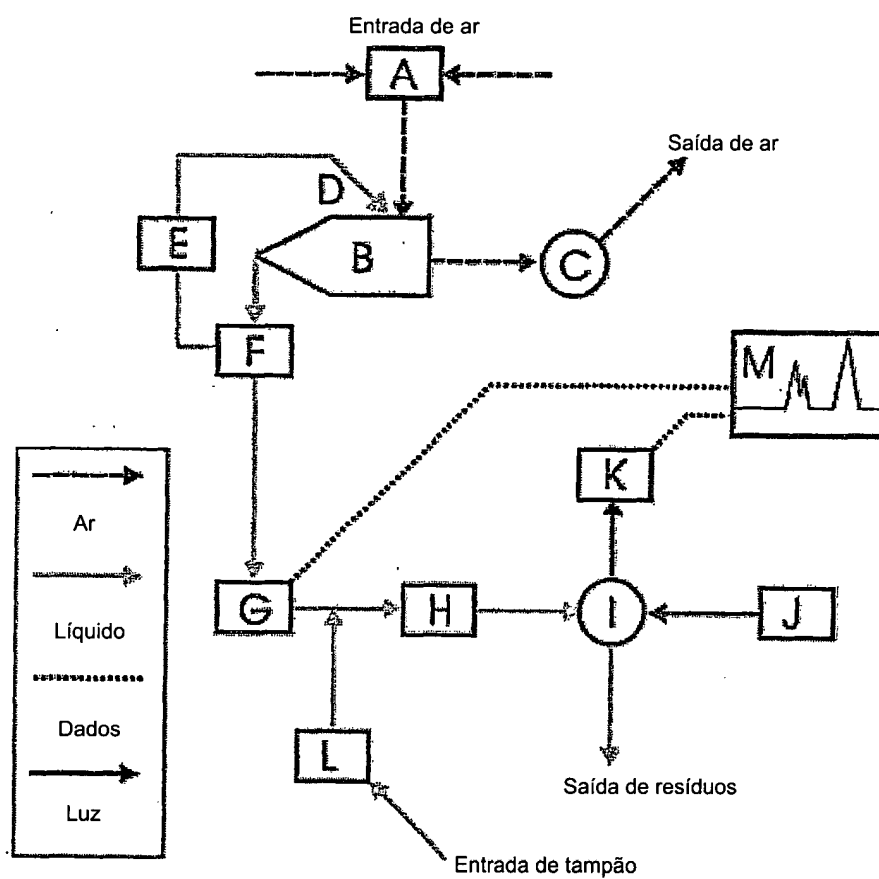


Fig.2



P10707601-0

RESUMO

Patente de Invenção: **"MONITORAMENTO DE MISTURAS DE ENZIMA".**

A invenção refere-se a um método para detecção simultânea da presença de pelo menos duas enzimas em uma amostra, o referido método compreendendo as etapas de: i) fornecimento de um primeiro substrato para uma primeira enzima, o referido primeiro substrato sendo rotulado com um primeiro fluoróforo, ii) fornecimento de um segundo substrato para uma segunda enzima, o referido segundo substrato sendo rotulado com um segundo fluoróforo, iii) exposição dos substratos rotulados à amostra para permitir que as primeira e segunda enzimas presentes na amostra interajam com os respectivos primeiro e segundo substratos fluoróforo-rotulados para formar respectivos primeiro e segundo fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados; e detecção da presença dos referidos fragmentos de substrato fluoróforo-rotulados.