

Ressonância Magnética Nuclear: uma técnica não-invasiva para observar em tempo real metabolitos em células vivas†

ANA RAMOS¹, ANA RUTE NEVES¹, JONAS ALMEIDA^{1,2}, HELENA SANTOS*¹

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – UMA FERRAMENTA NÃO-AGRESSIVA PARA ESTUDAR FISIOLOGIA CELULAR

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) baseia-se na resposta a um campo magnético externo de núcleos que possuem momento magnético intrínseco (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{23}Na , etc). Esta metodologia foi reconhecida, desde o início da década de 50, como uma técnica poderosa para a elucidação da estrutura de moléculas em solução, tendo encontrado grande utilidade nas áreas da Química e da Bioquímica. As primeiras aplicações de NMR ao estudo de sistemas vivos estavam seriamente limitadas pela baixa resolução conseguida com a instrumentação então disponível, mas o desenvolvimento de magnetos supercondutores, no final da década de 60, revolucionou a utilização de NMR, abrindo perspectivas para a sua aplicação generalizada [1]. Em 1973, Moon e Richards demonstraram a utilidade da técnica para determinação de pH intracelular em eritrócitos intactos, tirando partido da dependência com o pH da frequência de ressonância de ^{31}P do fosfato inorgânico intracelular [2]. Sensivelmente na mesma altura, foi provado que a detecção dos núcleos de ^{13}C podia ser utilizada para monitorizar os produtos finais do metabolismo [3]. Um dos aspectos mais atractivos da aplicação da espectroscopia de NMR para estudar fisiologia celular deriva das suas características não-invasivas e não-destrutivas, evidenciadas pelo elevado número de aplicações clínicas desta técnica, nomeadamente pela possibilidade de obter imagens anatómicas de órgãos humanos em condições não-invasivas.

Embora as aplicações médicas lidarem, pelo menos a nível financeiro, os campos de utilização de NMR *in vivo*, a aplicação a sistemas microbianos forneceu contribuições valiosas para a compreensão de processos metabólicos, possibilitando pela primeira vez a determinação de parâmetros fi-

siológicos importantes em células intactas e metabolicamente activas. Permite obter informação sobre a concentração e distribuição de metabolitos e detectar variações nas concentrações intracelulares de metabolitos sem interferir com os processos biológicos, assim como monitorizar simultaneamente o consumo de substratos e a formação de produtos finais. A variedade de nuclídeos acessíveis a detecção por esta técnica permite a investigação de diversas facetas complementares nos processos biológicos. A detecção de ^{31}P , único isótopo natural do fósforo, permite avaliar os níveis de energização (níveis de ATP, ADP, fosfocreatina) nos sistemas em estudo, determinar o valor de pH intracelular, gradientes protónicos transmembranares e ainda, em casos particulares, determinar velocidades de reacções enzimáticas *in vivo*. A detecção de ^{23}Na ou ^{39}K possibilita a determinação de gradientes catiónicos, assim como a medição do transporte destes iões através das membranas celulares. A NMR de ^{13}C (ou ^{15}N) permite determinar o percurso de átomos individuais de carbono (ou de azoto), fornecidos em substratos especificamente enriquecidos nestes isótopos, ao longo de diferentes vias metabólicas; de facto, dadas as propriedades analíticas únicas desta técnica, é possível obter informação sobre a distribuição da marcação nos vários átomos da mesma molécula.

No final da década de 70, o trabalho de Shulman e colaboradores, demonstrou a utilidade da técnica de NMR de carbono para estudar fisiologia celular em condições não invasivas, nomeadamente para elucidar a cinética de formação de intermediários da via glicolítica em suspensões celulares de *Escherichia coli* [4]. Estes autores determinaram a taxa de consumo de glucose enriquecida com carbono 13 na posição 1, observaram a produção de lactato marcado na posição 3 como produto final maioritário e a acumulação do intermediário glicolítico 1,6-bisfosfo-frutose. Surpreendentemente, este metabolito encontrava-se marcado não apenas na posição 1, mas também na posição 6,

resultado interpretado pela ocorrência de redistribuição de marca devida à reversibilidade dos passos reacionais catalizados pela isomerase dos fosfatos de triose e pela aldolase (Figura 1). O enriquecimento no carbono 6 é tanto maior quanto maior o refluxo de carbono a nível da aldolase, e portanto estes dados permitiram retirar informação sobre fluxos metabólicos *in vivo*. Depois destes estudos pioneiros, a utilização de substratos enriquecidos com ^{13}C revelou-se uma técnica muito útil para a determinação de fluxos metabólicos e de metabolitos intracelulares em sistemas tão diferentes como bactérias lácticas, bactérias envolvidas no tratamento de águas residuais, leveduras e células animais [5, 6, 7, 8, 9].

A principal limitação da espectroscopia de NMR deriva da sua baixa sensibilidade intrínseca, o que impõe a utilização de suspensões celulares densas, com o objectivo de aumentar o espaço intracelular na zona de detecção do espectrómetro. Por outro lado, a baixa sensibilidade também pode ser olhada como vantagem, visto que em sistemas tão complexos como as células vivas, a detecção de um número muito elevado de compostos inviabilizaria a análise dos espectros devido à extensa sobreposição de sinais. Moléculas de grande peso molecular, tais como proteínas ou ácidos nucleicos, também não são detectáveis devido ao alargamento dos sinais provocado pela baixa mobilidade destes compostos. Em suma, são susceptíveis de ser detectados metabolitos livres de baixa massa molecular, desde que presentes em concentração intracelular na gama dos mM.

Em muitos casos, as limitações são largamente ultrapassadas pela vantagem única proporcionada por esta técnica de permitir monitorizar vários parâmetros bioquímicos sem perturbar a estrutura e organização celulares [10]. Para melhor ilustrar as potencialidades da técnica, este artigo foca a aplicação de NMR para estudar o metabolismo de glucose em bactérias lácticas. O objectivo a longo prazo destes estudos é obter informa-

Fig. 1

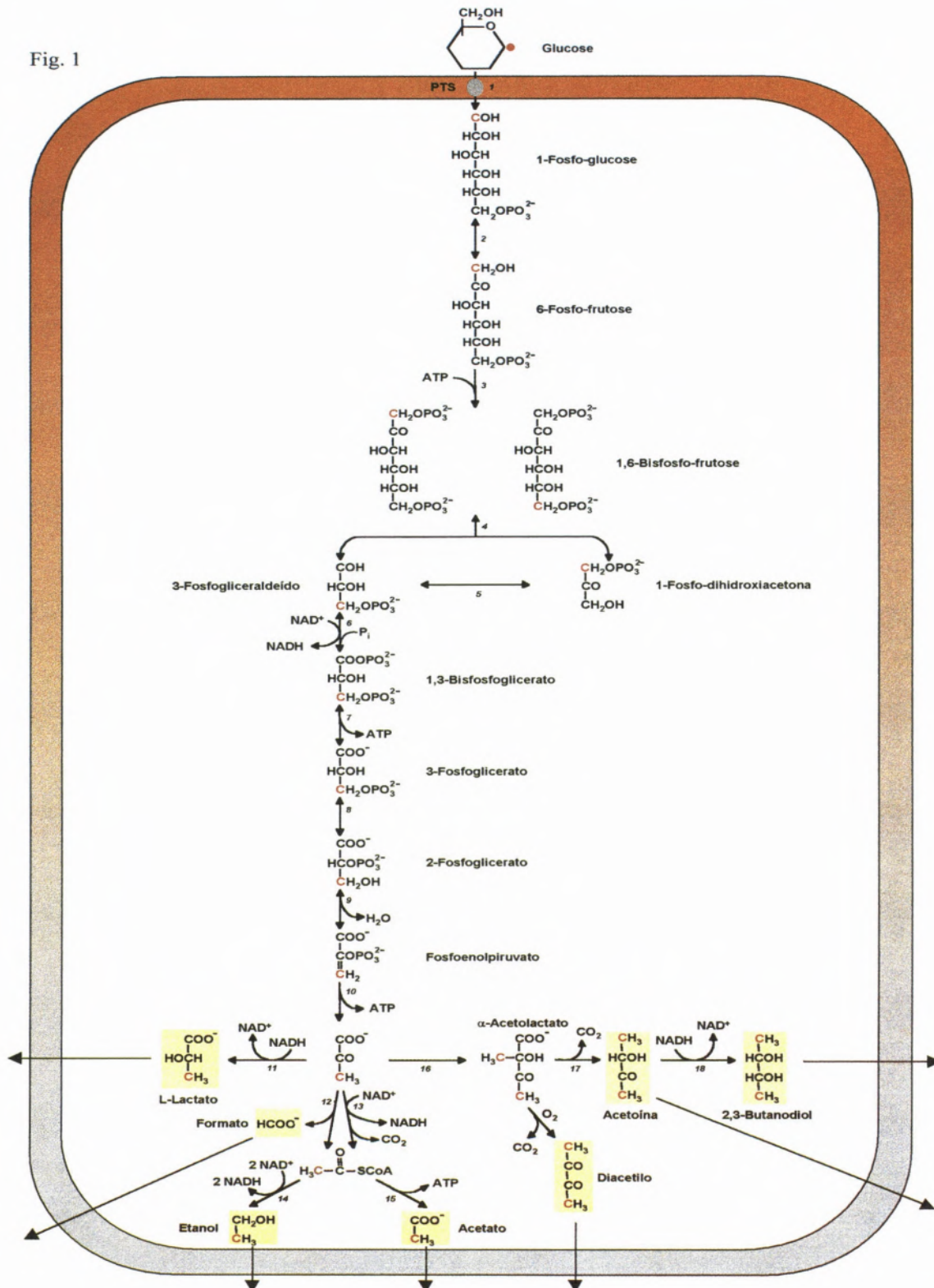


Fig. 1 - Metabolismo de glucose e de piruvato em *Lactococcus lactis*. As reações representadas são catalizadas pelas seguintes enzimas: 1. sistema fosfoenolpiruvato: fosfotransferase (PEP:PTS); 2. isomerase da 6-fosfo-glucose; 3. cinase da 6-fosfo-frutose; 4. aldolase da 1,6-bisfosfo-frutose; 5. isomerase dos fosfatos de trioses; 6. desidrogenase do 3-fosfogliceraldeído; 7. cinase do 3-fosfoglicerato; 8. mutase do fosfoglicerato; 9. enolase; 10. cinase do piruvato; 11. desidrogenase do lactato; 12. liase do piruvato-formato; 13. desidrogenase do piruvato; 14. desidrogenase do acetaldeído e desidrogenase do etanol; 15. cinase do acetato; 16. sintetase do α-acetolactato; 17. descarboxilase do α-acetolactato; 18. desidrogenase do 2,3-butanodiol.

ção bioquímica de confiança que permita servir de directiva para as intervenções genéticas tendentes a desviar o fluxo metabólico nestes organismos para a produção de compostos com interesse na indústria dos lacticínios, nomeadamente de diacetilo. Este é o objectivo de uma área de grande actualidade, geralmente designada por Engenharia Metabólica.

BACTÉRIAS LÁCTICAS: APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA

As bactérias lácticas desempenham um papel fundamental na produção de alimentos e bebidas fermentados. Em todos os processos que envolvem fermentações com estes organismos, a qualidade dos produtos finais depende da existência de estirpes adequadas, denominadas culturas de arranque, que conferem aos alimentos as características desejadas, nomeadamente, de aroma e textura. No entanto, é comum verificar comportamento irregular no desempenho das culturas de arranque lácticas, além de instabilidade de propriedades importantes do ponto de vista industrial [11]. A solução para estes problemas exige uma abordagem multidisciplinar e integrada da fisiologia, bioquímica e genética das bactérias lácticas. *Lactococcus lactis* (Figura 2) tem um papel muito importante em todas as fermentações lácteas (produção de queijo, iogurte e manteiga), uma vez que o lactato (o produto final predominante do metabolismo de glucose ou lactose) provoca uma descida acentuada de pH, impedindo o crescimento de microrganismos indesejáveis que poderiam tornar o alimento impróprio para consumo. *Lactococcus lactis* metaboliza a glucose pela via apresentada na Figura 1. A glucose é fosforilada concomitantemente com o processo de transporte para dentro da célula; uma vez na forma de 6-fosfoglucose, este composto é convertido em 1,6-bisfosfo-frutose pela acção sequencial de duas enzimas, a isomerase da 6-fosfo-glucose e a cinase da



Fig. 2. Fotomicrografia de uma cultura de *Lactococcus lactis*.

6-fosfo-frutose. No passo seguinte a 1,6-bisfosfo-frutose é clivada, originando dois metabolitos com três átomos de carbono, o fosfato de dihidroxiacetona e o 3-fosfogliceraldeído, sendo este último convertido em 1,3-bisfosfoglicerato numa reacção redox em que o aceitador de electrões é a coenzima NAD^+ . O intermediário 1,3-bisfosfoglicerato é finalmente transformado em piruvato pela acção sucessiva de várias enzimas. Para que esta via metabólica, designada glicólise, funcione tem que haver regeneração do NAD^+ consumido no passo redox. Esta regeneração dá-se preferencialmente através da redução de piruvato a lactato, catalisada pela desidrogenase do lactato, em que o dador de electrões é a forma reduzida de NAD^+ , isto é, $NADH$. Portanto, em condições anaeróbias, *L. lactis* transforma hidratos de carbono em lactato, através de um processo metabólico designado homofermentativo. No entanto, o perfil de produtos finais pode ser influenciado por diversos parâmetros ambientais, nomeadamente, pressão parcial de oxigénio na atmosfera, pH do meio e acessibilidade de nutrientes. Estes parâmetros determinam o destino do produto final da glicólise, piruvato, que pode ser convertido em vários compostos nomeadamente, formato, acetato, etanol, acetoina, diacetilo e 2,3-butanodiol. Por exemplo, quando a concentração de

hidratos de carbono é limitada, observa-se um desvio metabólico no sentido da produção de acetato, formato e etanol; a enzima-chave deste tipo de fermentação é a liase do piruvato-formato que converte o piruvato em formato e acetil-Coenzima A. O grupo acetilo é subsequentemente reduzido, formando-se etanol, em duas reacções que envolvem regeneração de NAD^+ , podendo assim contribuir para a manutenção do balanço redox celular.

Em condições de aerobiose e pH ácido, o piruvato pode ser processado por uma via alternativa originando acetoina, diacetilo e 2,3-butanodiol como produtos finais. O diacetilo contribui de forma positiva para as características organolépticas dos produtos lácteos; este composto deriva do piruvato através de duas reacções [12]; a primeira, catalizada pela enzima sintetase do α -acetolactato, consiste na condensação de duas moléculas de piruvato, originando α -acetolactato; a segunda consiste na descarboxilação química deste composto na presença de oxigénio, da qual resulta a formação de diacetilo (Figura 1).

Em condições aeróbias, a oxidação de $NADH$ (e consequente regeneração de NAD^+) pode fazer-se por transferência de electrões para o oxigénio, numa reacção catalizada pela enzima oxidase do $NADH$. Esta possibilidade tem consequências no per-

fil de produtos finais, conduzindo a uma diminuição nas proporções de lactato e etanol, cuja produção está directamente acoplada à regeneração de NAD^+ , e a um aumento nas proporções de acetoína e acetato.

O metabolismo relativamente simples de *L. lactis* e a existência de numerosas ferramentas genéticas para a sua manipulação torna-o, à partida, um sistema adequado para a implementação de estratégias de engenharia metabólica visando a construção de estirpes com desempenho industrial eficaz. Com o objectivo de direccionar o metabolismo de hidratos de carbono para a produção de diacetilo, foi construída uma estirpe de *L. lactis* em que o gene que codifica para a desidrogenase do lactato foi inactivado e em que, simultaneamente, se estimulou a expressão do gene que codifica a sintetase do α -acetolactato [13]. Esta estratégia baseava-se na previsão de que a diminuição da actividade da enzima responsável pela formação de lactato e o estímulo simultâneo da actividade que cataliza o primeiro passo na conversão de piruvato em diacetilo, conduziria a um desvio do fluxo de carbono para produzir diacetilo em vez de lactato; no entanto, na prática não se verificou um aumento apreciável da produção de diacetilo. Numa outra estirpe em que a actividade da desidrogenase do lactato foi suprimida por manipulação genética, verificou-se um desvio para a produção de 1-fosfo-manitol e manitol, em resposta à elevada pressão para regenerar NAD^+ criada pela deficiência na enzima cuja actividade é a principal responsável por essa regeneração. Também neste caso o fluxo de carbono para a produção de diacetilo foi diminuído [14]. Estes insucessos mostram bem que o direccionamento do metabolismo para a síntese de produtos desejados, e/ou diminuição da produção de compostos prejudiciais, só será possível através de um conhecimento detalhado das redes metabólicas e dos processos regulatórios envolvidos [15]. Devido à complexidade destas redes e à forte interdependência existente entre os vários pas-

sos metabólicos, é irrealista pensar que a optimização de estirpes microbianas possa ser alcançada apenas por uma abordagem eurística. De facto, existe um número crescente de dados indicando que a única estratégia eficiente para conseguir o melhoramento de estirpes passa pelo desenvolvimento de modelos matemáticos que permitam uma análise integrada dos dados experimentais relativos a fluxos metabólicos e a concentrações intracelulares de metabolitos [16]. Uma vez que a fiabilidade dos modelos metabólicos depende crucialmente da quantidade e qualidade dos dados experimentais em que se baseiam, torna-se essencial desenvolver metodologias que permitam a determinação precisa de parâmetros intracelulares *in vivo*, e em particular, que forneçam informação sobre as concentrações intracelulares de intermediários metabólicos relevantes.

SISTEMA PARA DETECÇÃO DIRECTA DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS POR NMR

Para tirar cabalmente partido das características de não-invasividade da técnica de NMR torna-se imperioso desenvolver estratégias que permitam manter as suspensões ce-

lulares em condições fisiológicas, assim como assegurar um fornecimento adequado de substratos e de gases. Para atingir este objectivo têm sido desenvolvidos e optimizados diversos sistemas de circulação [17, 18] e biorreactores que se adaptam às sondas de NMR [19]; sistemas estes que têm sido utilizados especialmente em experiências acopladas à detecção de ^{31}P para a determinação de metabolitos fosforilados. Todavia, a utilidade desta abordagem para a determinação da concentração de metabolitos fosforilados *in vivo* é altamente limitada pela sobreposição de ressonâncias, sobretudo na região dos fosfomonoésteres, onde se detecta a maioria dos intermediários da glicólise. Como o núcleo de ^{13}C tem uma gama mais alargada de desvios químicos, esta é a técnica ideal para a determinação directa de metabolitos, desde que o custo do substrato marcado não seja proibitivo.

Esta metodologia foi utilizada para obter informação sobre parâmetros intracelulares *in vivo*, durante o metabolismo de glucose por suspensões celulares de *L. lactis* em condições controladas de pH, temperatura e atmosfera gasosa. Para tal, utilizámos o sistema de circulação representado esquematicamente na Figura 3 e que consiste num mini-fermentador

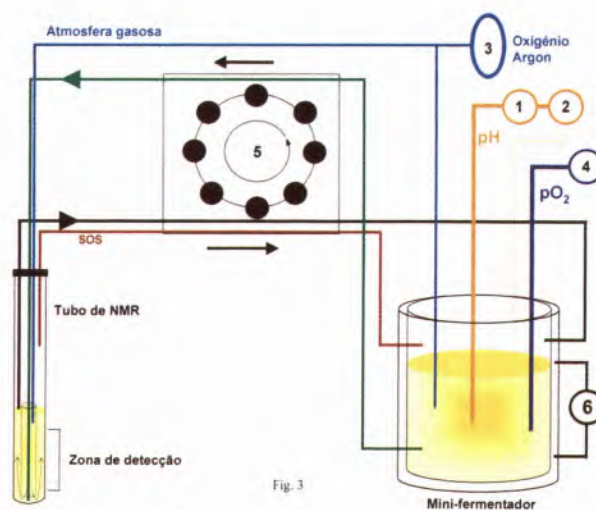


Fig. 3

Fig. 3 - Diagrama do dispositivo experimental usado nas experiências de NMR *in vivo*. 1, electrodo de pH; 2, controlador de pH; 3, linhas para fornecimento de gases; 4, electrodo de oxigénio; 5, bomba peristáltica; 6, banho de água; SOS, linha de segurança.

com capacidade de 50 ml, acoplado ao espectrómetro de NMR por um sistema de tubagem por onde é bombeada a suspensão celular [20]. O valor do pH é continuamente controlado e o nível de oxigénio monitorizado. Estes são dois parâmetros com grande impacto no metabolismo de *L. lactis*.

ESTUDO DO METABOLISMO DE GLUCOSE EM *L. LACTIS* POR NMR DE CARBONO 13 *IN VIVO*

Na Figura 4 mostra-se uma sequência de espectros adquiridos durante o metabolismo de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose em condições anaeróbias. A resolução temporal é de 30 segundos nas condições experimentais utilizadas. Imediatamente após a adição de glucose foi detectada a ressonância do lactato marcado no grupo metilo ($\delta = 20.4$ ppm), cuja intensidade aumentou ao longo do tempo até ao esgotamento da glucose. O metabolismo de glucose originou, além de lactato, pequenas quantidades de acetato e 2,3-butanodiol. As ressonâncias de menor intensidade detectadas a 65.0 e 66.4 ppm foram identificadas como devidas a 1,6-bisfosfofrutose (FBP), um metabolito intermediário da via glicolítica (Figura 1); a ressonância a 66.4 ppm é devida à FBP enriquecida com carbono 13 na posição 1 (derivada directamente da glucose marcada no carbono 1), enquanto o pico a 65.0 ppm é devido ao isotópomo do mesmo composto em que a marcação se encontra no carbono 6. A partir do momento em que a glucose se esgotou, foram detectadas as ressonâncias dos átomos de carbono na posição 3 do 3-fosfoglicerato (3-PGA) a 67.4 ppm e do fosfoenolpiruvato (PEP) a 101.2 ppm.

A cinética de consumo de glucose e a formação de produtos finais e de metabolitos intracelulares obtida a partir da sequência de espectros da Figura 4 está representada na Figura 5. A concentração intracelular de FBP atingiu um máximo de 40 mM e começou a diminuir no momento do esgotamento da glucose.

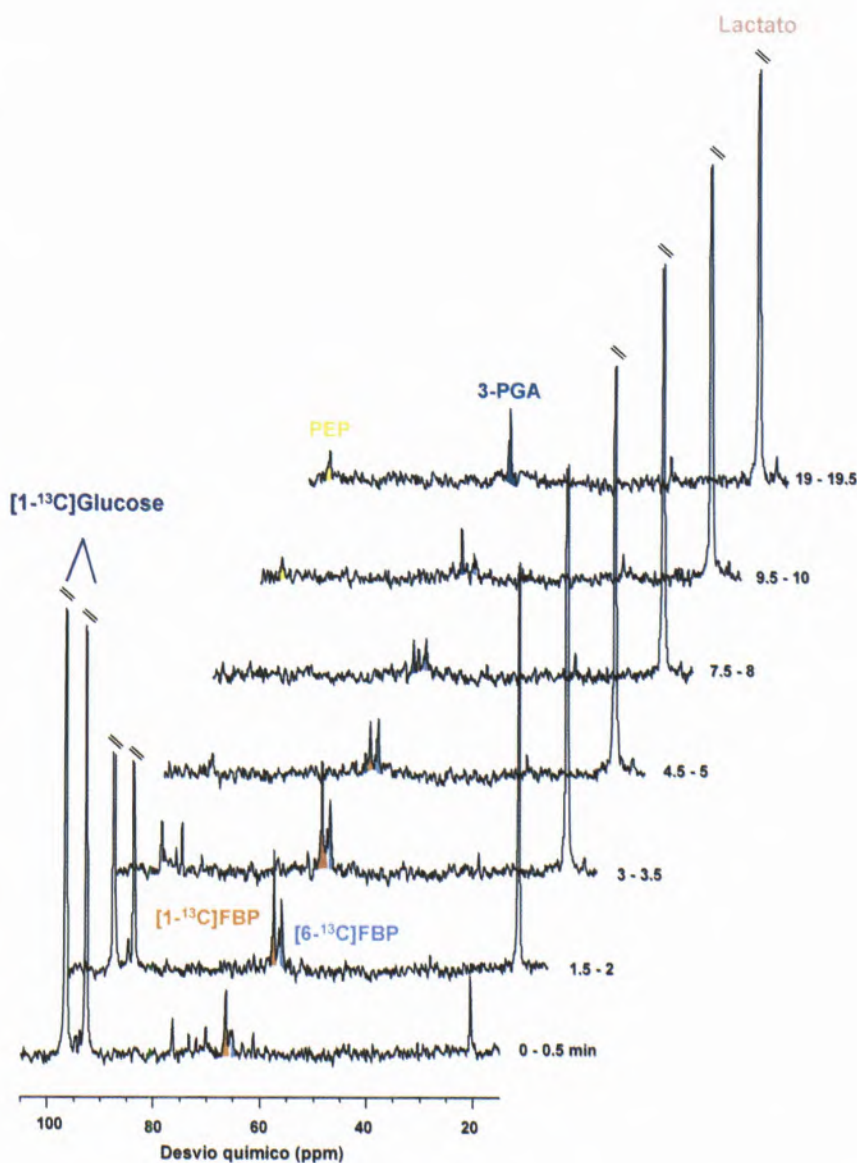


Fig. 4 - Metabolismo de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (20 mM) por uma suspensão celular de *L. lactis* MG5267 em anaerobiose, estudado *in vivo* por NMR de carbono 13. Cada espectro representa 30 segundos de acumulação. A glucose foi adicionada ao tempo zero e os espectros foram adquiridos durante os intervalos de tempo indicados. (*) aspartato; (●) 2,3-butanodiol.

se, ainda que a uma velocidade consideravelmente inferior à observada para o consumo deste hidrato de carbono. Na literatura encontram-se descritos valores muito discrepantes no que diz respeito aos níveis de intermediários glicolíticos em *L. lactis*, possivelmente porque estes dados foram obtidos *in vitro*, em extractos celulares. A acumulação de 3-PGA

na ausência de nutriente foi interpretada como sendo devida à inactivação da cinase do piruvato, causada pela acumulação de fosfato inorgânico (ver evolução mais adiante), assim como pela ausência de activadores da mesma enzima, nomeadamente a 6-fosfo-glucose e a FBP [21, 22].

Sob atmosfera de oxigénio o

metabolismo de glucose originou também lactato como produto final maioritário e quantidades vestigiais de acetato e 2,3-butanodiol. Não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações máximas dos metabolitos intracelulares; no

entanto, a velocidade à qual a FBP foi consumida após o desaparecimento da glucose aumentou de forma significativa quando comparada com o perfil observado em anaerobiose (comparar dados nas Figuras 5 e 6).

MONITORIZAÇÃO DO pH INTRACELULAR E DO NÍVEL DE ENERGIZAÇÃO POR ^{31}P -NMR *IN VIVO*

A detecção de ^{31}P por NMR permitiu obter informação complemen-

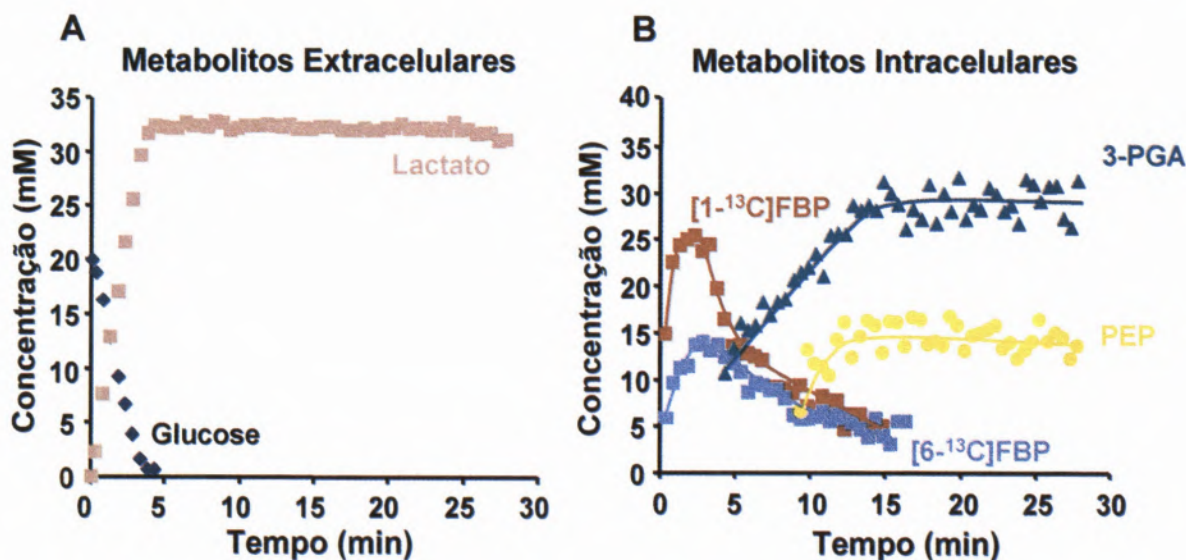


Fig. 5 - Cinética do consumo de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose e formação de produtos (A); cinética dos metabolitos intracelulares (B), em anaerobiose. As concentrações dos intermediários metabólicos foram obtidas a partir das experiências de NMR *in vivo*. Símbolos: (♦), glucose; (■), lactato; (■), $[1-^{13}\text{C}]$ FBP; (■), $[6-^{13}\text{C}]$ FBP; (▲), 3-PGA; (●), PEP.

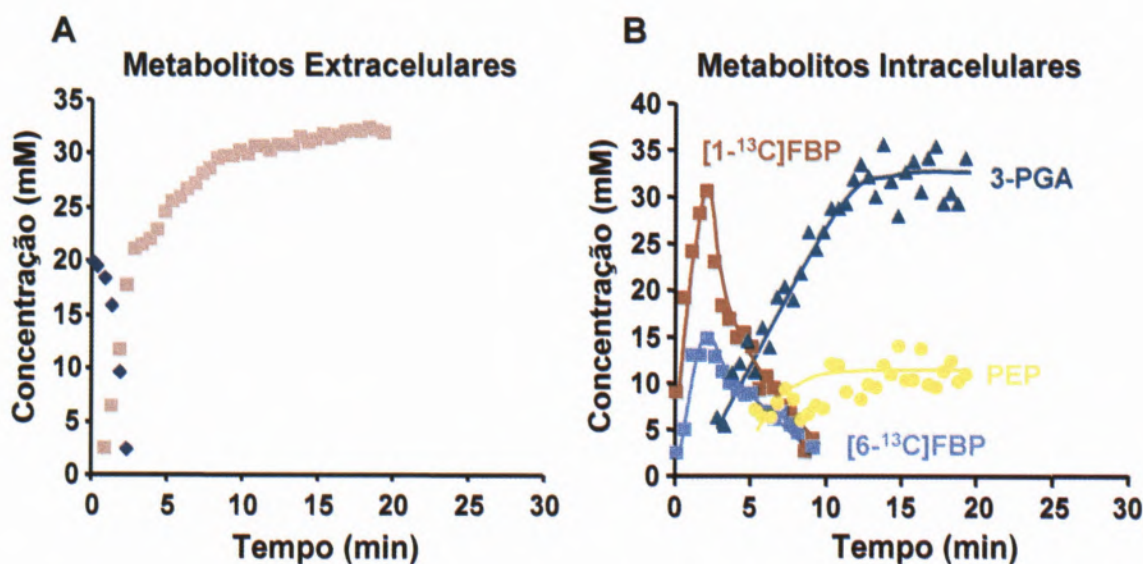


Fig. 6 - Cinética do consumo de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose e formação de produtos (A); cinética dos metabolitos intracelulares (B), em aerobiose. Símbolos: (♦), glucose; (■), lactato; (■), $[1-^{13}\text{C}]$ FBP; (■), $[6-^{13}\text{C}]$ FBP; (▲), 3-PGA; (●), PEP.

tar à conseguida por NMR de ^{13}C , nomeadamente monitorização do valor de pH intracelular, nível de energização celular (conteúdo em ATP) e concentração de fosfato inorgânico ao longo do metabolismo da glucose. No espectro adquirido imediatamente antes da adição de glucose, observa-se uma ressonância larga a 2.6 ppm, na região dos fosfomonoésteres, que corresponde principalmente ao 3-PGA (Figura 7); o fosfato inorgânico dá origem a uma ressonância intensa aproximadamente a 1 ppm. Após a

adição de glucose a ressonância do fosfato inorgânico diminuiu em intensidade de forma drástica, e desviou-se para a esquerda, denunciando o consumo de fosfato e um aumento do valor de pH interno. Detectou-se uma ressonância de grande intensidade na região dos fosfomonoésteres, cujo componente principal se confirmou ser FBP. A concentração de NTP (componente maioritário é ATP) aumentou de níveis não-detectáveis para um máximo de 8 mM, mantendo-se constante por um período de

tempo prolongado após o desaparecimento completo de glucose. O desvio químico da ressonância do fosfato inorgânico depende do pH, o que permitiu a determinação do pH interno, utilizando uma curva de calibração adequada. Nas condições experimentais usadas (pH extracelular controlado a 6.5) o pH intracelular determinado na ausência de glucose foi 6.3, tendo aumentado para 7.1 imediatamente após a adição do nutriente, valor este que se manteve constante durante um período de tempo considerável mesmo após o esgotamento da glucose (Figura 8).

MODELIZAÇÃO MATEMÁTICA DA GLICÓLISE

A modelização matemática da glicólise efectuada teve como objectivo a interpretação dos resultados experimentais obtidos de forma a desenvolver uma descrição mecanística unificadora. Os dados de partida foram a evolução temporal das concentrações de glucose, FBP, 3-PGA, PEP e lactato obtidas por NMR *in vivo*. A formulação da cinética glicolítica foi simplificada de forma a incluir apenas os metabolitos observados *in vivo*, não tendo sido considerados quaisquer processos de activação/inibição enzimática. O modelo obtido, cuja simulação para condições de ausência de oxigénio está representada na Figura 9 (linhas a cheio), sugere que é a limitação de NAD^+ que justifica a acumulação de FBP. De forma a confirmar a validade do modelo, este foi usado para antever o efeito da presença de oxigénio, duplicando a actividade da oxidase do NADH no modelo obtido em anaerobiose. A simulação obtida nestas condições (linhas a tracejado) sugere que o oxigénio não deverá ter um efeito acentuado no perfil de NADH desde que a concentração de glucose não seja limitante. Esta previsão é, de facto, confirmada pelos resultados experimentais (ver Figura 6); como previsto, a taxa de consumo de glucose não é significativamente afectada pelo arejamento mas o consumo de FBP é significati-

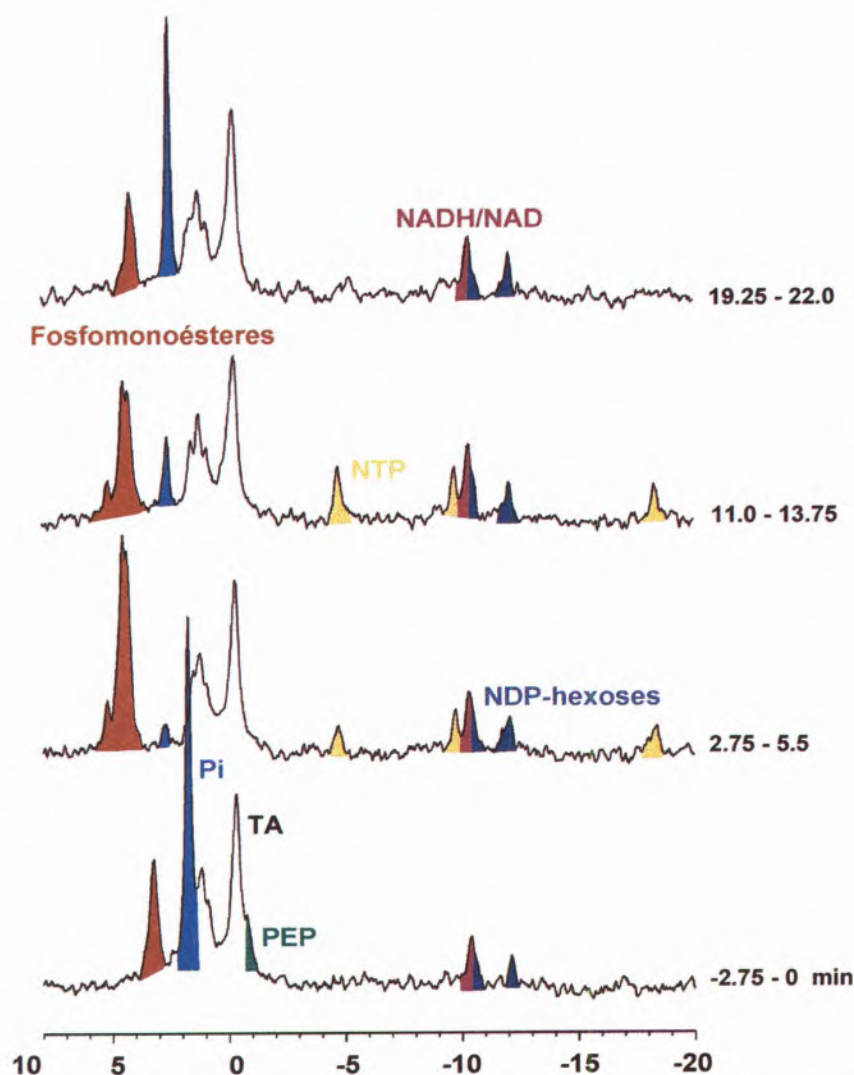


Fig. 7 - Sequência de espectros de NMR de ^{31}P obtidos durante o metabolismo de glucose (50 mM) em condições de anaerobiose e pH controlado a 6.5. Abreviaturas: NTP, trifosfatos de nucleósidos; PME, fosfomonoésteres; TA, ácido teicóico; Pi_{cit} , fosfato inorgânico citoplasmático; PEP, fosfoenolpiruvato. Cada espectro representa 2.75 min de aquisição. A glucose foi fornecida ao tempo zero; os espectros seleccionados para esta figura foram adquiridos aos intervalos de tempo indicados e processados com uma exponencial de 20 Hz.

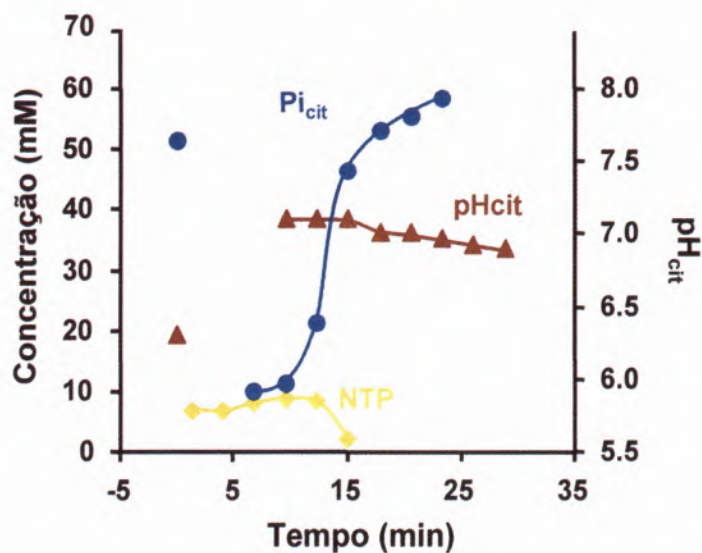


Fig. 8 – Evolução do pH intracelular, carga energética e concentração de fosfato inorgânico intracelular durante o metabolismo de glucose. Os valores de concentração de trifosfatos de nucleósidos (NTP) e de fosfato inorgânico intracelular (Pi_{cit}) foram obtidos a partir dos dados da experiência representada na Fig. 7. O pH intracelular foi determinado a partir da variação do desvio químico da ressonância do fosfato inorgânico intracelular, utilizando uma curva de calibração adequada.

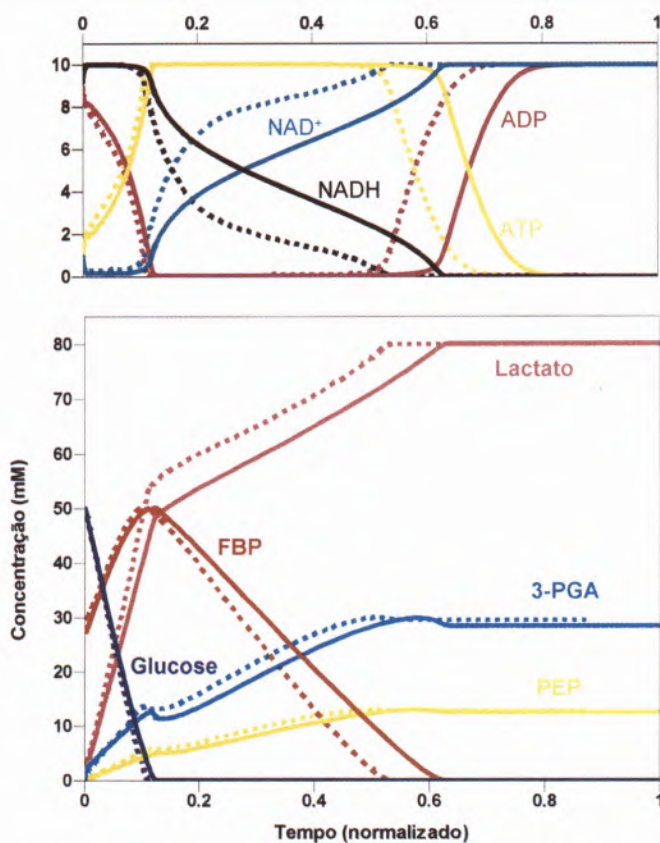


Fig. 9 – Modelo metabólico da glicólise em *Lactococcus lactis*. O modelo foi construído utilizando os dados obtidos nas experiências de NMR *in vivo* e otimizado para condições de anaerobiose (linhas a cheio). A simulação do efeito do oxigénio, obtido pela duplicação da actividade da oxidase do NADH está também representada (linhas a tracejado).

vamente mais rápido. A aceleração da taxa de consumo de FBP é justificada pelo modelo como sendo consequência dos níveis mais elevados de NAD^+ previstos pelo modelo e causados pela limitação por glucose. No que respeita aos níveis de ATP, a simulação do modelo sugere que estes atinjam os valores mais elevados logo após o consumo total da glucose, o que é de facto confirmado pelos resultados obtidos por NMR de fósforo 31. A previsão correcta dos níveis de ATP sugere que o modelo desenvolvido reproduz correctamente a cinética glicolítica em *L. lactis*. Assim, podemos concluir que o direccionamento do metabolismo de glucose para a produção de compostos com interesse industrial requer uma estratégia que acelere a oxidação de NADH, por exemplo por aumento da actividade da enzima oxidase do NADH.

NOTA FINAL

A utilidade da técnica de NMR para a monitorização directa de vários parâmetros bioquímicos em suspensões celulares ficou patente nos resultados apresentados relativos ao metabolismo da glucose em *Lactococcus lactis*. O modelo metabólico desenvolvido com os dados de NMR sugere que as coenzimas $NAD^+/NADH$ têm um papel central na regulação metabólica deste organismo. Esta hipótese será testada com o desenvolvimento em curso de um procedimento que permite marcar com carbono 13 estas coenzimas de modo a viabilizar a sua quantificação *in vivo* por NMR de carbono 13.

A complexidade inerente às redes metabólicas representa um obstáculo sério à sua racionalização mecanística. Desta forma, o desenvolvimento de modelos preditivos estará dependente da capacidade de identificar interdependências directamente a partir dos dados experimentais. A abordagem futura para alcançar este objectivo passa pelo recurso a técnicas de aprendizagem artificial, nomeadamente redes neuronais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Projectos PRAXIS/PCNA/P/BIO/39/96 e PRAXIS/P/BIA/11072/98.

- ¹ Instituto de Tecnologia Química e Biológica/Universidade Nova de Lisboa e Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Rua da Quinta Grande, 6, Apartado 127, 2780-156 Oeiras, Portugal
- ² Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2825 Monte de Caparica, Portugal.
- * Este trabalho foi um dos dois distinguidos com o Prémio Gulbenkian 1998 na área da Química. O outro, da autoria do Prof. Fernando Pina, FCTUNL, foi já publicado no "Química" nº 76

† Endereço electrónico: santos@itqb.unl.pt

REFERÊNCIAS

- Gadian, D. G. Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Clarendon Press, Oxford, 1982.
- Moon, R. B., Richards, J. H. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 7276.
- Séquin, U., Scott A. I. Carbon 13 as a label in biosynthetic studies. *Science* **186** (1974) 101.
- Ugurbil, K., Brown, T. R., den Hollander, J. A., Glynn, P., Schulman, R. G. High-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1978) 3742.
- Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L., Sahm, H. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49** (1996) 111.
- Ramos, A., Santos, H. Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenos*, a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996) 2577.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T., Wutrich, K. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol.* **15** (1997) 448.
- Veiga-da-Cunha, M., Firme, P., San Romão, M.V., Santos, H. Application of ¹³C nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 2271.
- Pereira, H., Lemos, P. C., Reis, M. A. M., Crespo, J. P. S. G., Carrondo, M. J. T., Santos, H. Model for carbon metabolism in biological phosphorous removal processes based on *in vivo* ¹³C-labelling NMR experiments. *Water Res.* **9** (1996) 2128.
- Santos, H., Fareleira, P., Ramos, A., Pereira H., Miranda, M. Nuclear magnetic resonance: a noninvasive technique in the study of life processes *in situ*. *Rev. Port. Quím.* **2** (1995) 3.
- de Vos, W. M. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70** (1996) 223.
- Ramos, A., Jordan, K. N., Cogan, T. M., Santos, H. Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (1994) 1739.
- Platteeuw, C., Hugenholtz, J., Starrenburg, M., van Alen-Boerrigter, I., de Vos, W. M. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of α -acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 3967.
- Neves, A. R., Ramos, A., Shearman C., Gasson, M. J., Santos, H. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using ¹³C-NMR. Submetido ao *Eur. J. Biochem.*
- Bailey, J. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252** (1991) 1668.
- Mendes, P., Kell, D. Making cells work - metabolic engineering for everyone. *TIBTECH* **15** (1997) 6.
- Chen, R., Bailey, J. E. Observations of aerobic, growing *Escherichia coli* using an on-line nuclear magnetic resonance spectroscopy system. *Biotechnol. Bioeng.* **42** (1993) 215.
- Sijbesma, W. F. H., Almeida, J. S., Reis, M. A. M., Santos, H. Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an *in vivo* ³¹P-NMR study. *Biotechnol. Bioeng.* **52** (1996) 176.
- Hartbrich, A., Schmitz, G., Weuster-Botz, D., de Graaf, A. A., Wandrey, C. Development and application of a membrane cyclone reactor for *in vivo* NMR spectroscopy with high microbial densities. *Biotechnol. Bioeng.* **51** (1996) 624.
- Neves, A. R., Ramos, A., Nunes, M. C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., de Vos, W. M., Almeida, J., Santos, H. Modelling glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis* using *in vivo* NMR data. *Biotechnol. Bioeng.* **64** (1999) 200.
- Mason, P. W., Carbon, D. P., Cushman, R. A. and Waggoner, A. S. The importance of inorganic phosphate in regulation of energy metabolism of *Streptococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 1861.
- Thompson, J., Torchia, D. A. Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **158** (1984) 791.



Equipamento de Laboratório
Balanças - Centrífugas - Aparelhos de pH - Tituladores
Condutoímetros - Agitadores - Espectrofotômetros
Microscópios - etc.

Vidros e Plásticos de Laboratório
Distribuidores NORMAX

Material Didático
Ensino Secundário e Superior
Representantes exclusivos SISTEDUC - Sistemas Educativos S.A.

Rua Soeiro Pereira Gomes, 15 r/c Frente
Bom Sucesso - 2615 Alverca
Telefs. (01) 957 04 20/1/2 - Fax (351-1-957 04 23) - Portugal

➤ Ensaios físicos de materiais:

- Tracção
- Compressão
- Flexão

➤ Extensometria



Outros equipamentos que representamos EXCLUSIVAMENTE:



(Japão) – Balanças de precisão



(Alemanha) – Moinhos, análise granulométrica (peneiros)



(Alemanha) – Estufas (universais, incubação, vazio, baixa temperatura)



(Alemanha) – Equipamento básico de laboratórios, nomeadamente:
Aagitadores (mecânicos/magnéticos/hélice), dispersor (UltraTurrax)...



EQUIPAMENTOS DE ANÁLISE E ENSAIO, LDA.

LISBOA

PORTO

Campo Mártires da Pátria, 110

R. de Real, 1210 - A/B - Moreira

Tels. (01) 352 85 41 · 356 04 54 · 352 72 93 · Fax (01) 352 87 52

Tels. (02) 948 69 05 · 948 68 68 · 948 68 47 · Fax (02) 948 61 32

Telem. 0931 60 67 25 · 1150 LISBOA · PORTUGAL

Telem. 0931 53 16 98 · 4470 MAIA · PORTUGAL