

# SÍNTESE DE SONDAS FLUOROGÊNICAS PARA A TRIAGEM DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MICRORGANISMOS E BIOCATALISE CONVENCIONAL

Morgana Gleibe Lúcio (IC), Simone M. Mantovani (PG), Luciana G. de Oliveira (PQ), Anita J. Marsaioli (PQ)<sup>1</sup>, Manuella Nóbrega Dourado (IC), Wellington Luiz Araújo (PQ)<sup>2</sup>.

[morganalucio@yahoo.com.br](mailto:morganalucio@yahoo.com.br); [anita@igm.unicamp.br](mailto:anita@igm.unicamp.br)

<sup>1</sup>UNICAMP, Instituto de Química, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas- SP, 13083-970, Brasil.

<sup>2</sup>ESALQ/USP, Depto de Genética, Av. Pádua Dias, 11, Cx. P. 83, Piracicaba-SP, 13400-970, Brasil

Palavras Chave: Triagem de Alto Desempenho – Biocatálise Convencional – Excesso Enantiométrico

## INTRODUÇÃO

Biocatalisadores são agentes biológicos (enzimas ou microrganismos) que aceleram a velocidade de reações químicas. O grande interesse na utilização industrial desses biocatalisadores é devido à sua capacidade de transformar uma variedade de substratos com alta especificidade, resultando em compostos com grande pureza enantiomérica.<sup>1,2</sup>

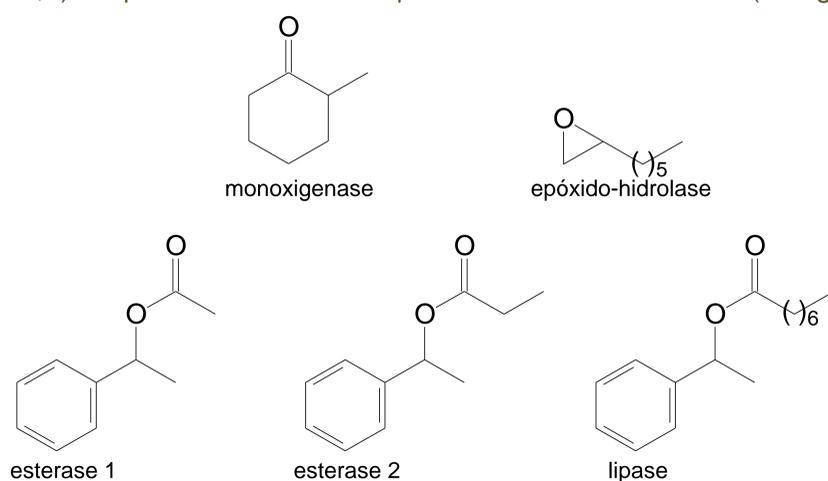
Neste projeto o objetivo geral foi investigar as atividades enzimáticas de microrganismos isolados da coleção de 74 *Methylobacterium* do Prof. Wellington Luiz Araújo da ESALQ de Piracicaba utilizando triagens de alto desempenho (HTS), que é a maneira mais rápida e simples de detectar a atividade enzimática. Após esta avaliação os melhores resultados foram legitimados utilizando a metodologia de biocatálise convencional com substratos de interesse, a fim de se obter informações sobre valores de conversão e excesso enantiométrico (ee).

## METODOLOGIA

Para a avaliação e identificação do perfil enzimático das bactérias foram utilizados cinco sondas fluorogênicas, para detecção de epóxido-hidrolases, esterases e lipases. Os melhores resultados obtidos pela metodologia de HTS foram validados utilizando a técnica denominada de “multibiorreações”, que baseia-se na reação de um microrganismo e vários substratos, com diferentes grupos funcionais, em um mesmo meio reacional.

Primeiramente as bactérias foram cultivadas em “slant” com o meio de cultivo  $\text{CHOI}_3$  contendo  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , solução de metais traço e metanol, por 48 h à 30 ° C. Posteriormente as células passaram por dois ciclos de crescimento, com 40 mL e depois 250 mL do mesmo meio de cultivo líquido, de 3-5 dias a 29 ° C sob agitação (150 rpm).

Após o período de crescimento, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e 2 g foram ressuspensas em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M, pH 7,0). Depois adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  dos substratos testados (10mg/mL):



**Figura 1:** Substratos utilizados nas reações de biotransformação - monoxigenase (1), epóxido-hidrolase (2), esterase 1 (3), esterase 2 (4) e lipase (5).

A suspensão resultante foi agitada em “shaker” à temperatura de 29 ° C, e monitoradas periodicamente tomando-se alíquotas de 1,0 mL. As alíquotas foram extraídas com 1,0 mL de acetato de etila, por centrifugação das células, após saturação da fase aquosa com NaCl. A fase orgânica foi retirada e seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para remoção de traços de água.

A análise foi conduzida por CG/MS (modelo HP 5973), empregando ionização por impacto eletrônico a 70 eV, coluna capilar de sílica fundida HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano, programação: 50 à 290 ° C com velocidade de aquecimento de 15 ° C/min, temperatura do injetor 240 ° C, volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ . O solvente utilizado na extração continha pentadecano 0,65 mg/mL como padrão interno.

Os valores de conversão foram calculados de acordo com o consumo de cada substrato no meio reacional.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de legitimar os resultados previamente observados nos ensaios por HTS quatro bactérias foram selecionadas para reações de biocatálise convencional, TC2, AR16/3, TC4/1 (2) e SR16/13 1.

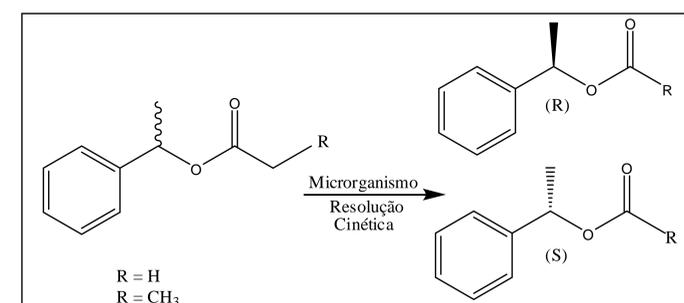
A tabela abaixo mostra que os ensaios de biotransformação confirmaram a atividade epóxido-hidrolase dos microrganismos AR16/3 e SR16/13 1. Para a atividade enzimática das esterases observamos que as bactérias AR16/3 e TC4/1 (2) exibiram alta taxa de conversão (>99%) para os substratos 2 e 3, respectivamente. Porém a primeira não se mostrou tão seletiva quanto à segunda, esta assim como a SR16/13 1 confirmaram a seletividade do substrato exibida nos ensaios de HTS, pois hidrolisaram preferencialmente o propionato.

**Tabela 1.** Reações de hidrólise dos substratos pelos microrganismos selecionados previamente nos ensaios de HTS

SUBSTRATOS	(% de conversão)			
	TC 2	AR 16/3	TC4/1(2)	SR16/13 1
2	0	98	10	96
3	43	> 99	38	39
4	48	97	> 99	95
5	0	77	77	76

Observou-se também que os microrganismos AR16/3 e SR16/13 1 hidrolisaram também oleatos (5), porém esta hidrólise foi muito lenta, ou seja, ele só foi consumido quando já não havia outros substratos no meio reacional.

Além da triagem de multibiorreação, as bactérias AR16/3 e SR16/13 1 foram avaliadas com respeito a enantiosseletividade dessas enzimas, visando obter os ésteres 2 e 3 ou o produto de hidrólise nas formas enantiomericamente enriquecidas por resolução cinética.



**Figura 2 :** Resolução cinética dos derivados esterificados do álcool  $\alpha$ -metilbenzílico.

Nestes ensaios de biocatálise convencional foi possível observar que o microrganismo AR16/3, após 1,5 h de reação, forneceu o feniletanodiol com 23 % de excesso enantiométrico para o substrato 19 e 34 % para o substrato 18, em favorecimento do enantiômero R em ambos os casos. Já a bactéria SR16/13 1 favoreceu o enantiômero S com um excesso enantiométrico ainda maior, 69% após 40 minutos de reação.

## CONCLUSÃO

A utilização de triagem de alto desempenho baseados em substratos fluorogênicos para monitoramento de atividades enzimáticas em células íntegras, permitiu a avaliação de 74 bactérias de forma simples e rápida. Estas atividades hidrolíticas e a seletividade dos substratos observadas nos experimentos de HTS foram confirmadas nos ensaios de biocatálise convencional.

Além disso, os ensaios de biotransformação permitiram selecionar alguns microrganismos com alta enantiosseletividade na resolução cinética de ésteres acetilados e propionilados, como AR 16/3 e SR16/13 1.

## AGRADECIMENTOS



1. Schimdt, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, 409, 258-268.

2. Bommarus, A. S.; Pollizi, K. M. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, 61, 1004-1016.