

INTRODUÇÃO

Cutinases são enzimas hidrolíticas que catalisam a degradação da cutina. Cutinases são dos menores membros da família serina hidrolase, que apresenta a tríade catalítica clássica composta por serina, histidina e um grupo carboxil. A cutinase pode ser produzida através de microorganismos e plantas. Os microorganismos que produzem essa enzima são fungos, bactérias e actinomicetos. As cutinases apresentam diversas características interessantes para aplicações em uma ampla gama de produtos, variando de detergentes a alimentos. Em baixa atividade de água é possível se realizar a transesterificação de óleos e gorduras ou esterificação estereoseletiva de álcoois. Alguns desses processos já são aplicados na indústria, enquanto outros ainda estão sendo investigados.

OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo:

- Semi-purificar as enzimas produzidas em diferentes meios de cultivo através da técnica de precipitação com sulfato de amônio;
- Submeter as enzimas brutas à eletroforese;
- Verificar sua aplicação, testando seu poder enantiosseletivo na substância racêmica 2-octanol com os ácidos octanóico e hexanóico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção da Cutinase

As enzimas foram produzidas pelo microorganismo *Fusarium oxysporum* em 4 meios de cultivo distintos: farelo de trigo, casca de soja, farelo de arroz e torta de pinhão manso.

Semi-purificação da Cutinase

Após a produção, os extratos obtidos foram semi-purificados e liofilizados, obtendo-se assim, um extrato bruto para cada meio de cultivo.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada eletroforese por SDS-PAGE dos extratos brutos com o objetivo de se comparar as frações de proteínas de cada um deles.

Reações de esterificação das enzimas brutas

Realizou-se reações esterificação adicionando-se 5 mg da enzima na mistura de 2-octanol (nas formas racêmica e enantiomericamente pura) com ácido octanóico ou ácido hexanóico.

Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas

A avaliação da capacidade de esterificação e enantiosseletividade das amostras catalisadas pelas enzimas de farelo de trigo e casca de soja foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa equipada com detector FID.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção da Cutinase

A enzima foi produzida em todos os meios testados confirmando que estes meios são propícios ao crescimento do microorganismo e posterior produção da enzima.

Atividade da cutinase

Na **Tabela 1** encontram-se os valores da atividade cutinólítica, calculados a partir da absorbância medida para os diferentes meios. A atividade foi medida como a quantidade de p-nitrofenol liberada (em μ moles) por minuto de reação por mL do sobrenadante (μ mol/min/mL).

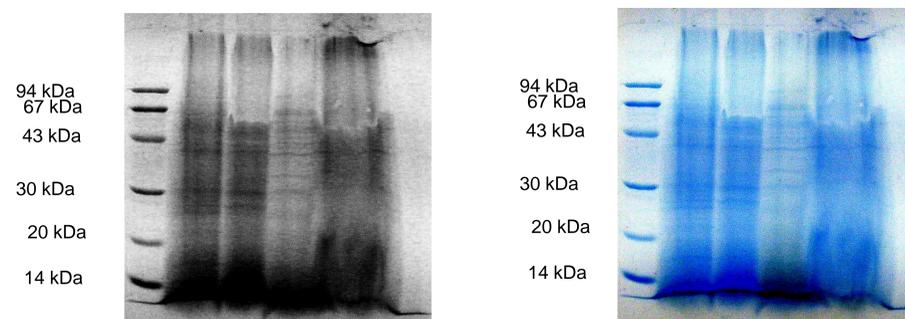
Tabela 1. Concentração da enzima, Absorbância e Atividade cutinólítica obtidas

Meio de cultivo	Concentração da Enzima (μ g/mL)	U/ml
Farelo de Trigo	5	15,3
Casca de Soja	5	15,5
Farelo de Arroz	10	9,42
Torta de Pinhão Manso	10	7,29

Pode-se observar uma variação no valor da atividade para cada meio de cultivo utilizado. As maiores atividades foram verificadas para a casca de soja e o farelo de trigo.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese por SDS-PAGE foi realizada com o objetivo de se comparar as frações protéicas presentes nos extratos brutos das enzimas produzidas nos diferentes meios (Figuras 3 e 4).



Figuras 3 e 4. Eletroforese SDS-PAGE em gel 12% das cutinases brutas. (P) padrão de baixa massa molecular, (1) enzima de farelo de trigo, (2) enzima de casca de soja, (3) enzima de torta de pinhão manso e (4) enzima de farelo de arroz

Concluiu-se que a banda com massa molecular de aproximadamente 27-30 kDa provavelmente era referente a cutinase, já que a literatura descreve esse valor para a enzima.

Caracterização enantiosseletiva das cutinases brutas

A Tabela 2 apresenta os valores de conversão (%c), excesso enantiomérico do produto (eep) e taxa enantiomérica (E) para a reação de esterificação do álcool racêmico 2-octanol com o ácido octanóico catalisada pelas cutinases produzidas nos meios de farelo de trigo e casca de soja (enzimas com maior potencial enantiosseletivo). Uma vez que a enzima produzida em casca de soja apresentou maiores valores para os três parâmetros avaliados, conclui-se que é mais enantiosseletiva quando comparada a produzida em farelo de trigo. Assim, como a enzima apresenta bons valores de conversão após 168 horas de reação, excesso enantiomérico e taxa enantiomérica, sua utilização para catalisar a resolução de álcoois racêmicos como o (*R,S*)-2-octanol, mostra-se bastante promissora.

Tabela 2. Esterificação do (*R,S*)-2-octanol com ácido octanóico catalisado pelas cutinases em hexano à 30° C e 168 horas de reação.

Substrato para produção das cutinases	c(%)	eep(%)	E
Farelo de trigo	38,3	45,6	3,5
Casca de soja	40,4	59,8	5,9

A Tabela 3 apresenta os valores de conversão (%c), excesso enantiomérico do produto (eep) e taxa enantiomérica (E) para a reação de esterificação do álcool racêmico 2-octanol com o ácido hexanóico catalisada pelas cutinases produzidas nos meios de farelo de trigo e casca de soja. Todos esses parâmetros analisados apresentaram valores inferiores quando comparados à reação com ácido octanóico. Para a taxa enantiomérica, observou-se o mesmo resultado para ambas enzimas.

Tabela 3. Esterificação do (*R,S*)-2-octanol com ácido hexanóico catalisado pelas cutinases em hexano à 30° C e 168 horas de reação

Substrato para produção das cutinases	c(%)	ee _p (%)	E
Farelo de trigo	6,8	25,7	1,7
Casca de soja	7,8	23,8	1,7

CONCLUSÃO

Ao longo de todas as etapas de realização do projeto, foi possível produzir a enzima em diferentes meios de cultivo, além de semi-purificá-la através da técnica de precipitação com sulfato de amônio. Além disso, através da eletroforese SDS-PAGE, observou-se que as enzimas, apesar de produzidas nos diferentes meios, apresentavam praticamente as mesmas frações de proteínas. No entanto, mesmo apresentando semelhança na constituição proteica, essas enzimas apresentaram algumas características particulares, como o fato da cutinase produzida em casca de soja ter sido a mais enantiosseletiva na catalisação da reação de esterificação entre o álcool racêmico 2-octanol e ácido octanóico.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela bolsa PIBIC de iniciação científica.