

Metodologia rápida para investigação da enantiosseletividade das reações enzimáticas

Maria Lair Sabóia de Oliveira Lima¹ (PG), Caroline da Costa Silva Gonçalves (PQ)¹, Juliana Cristina Barreiro² (PQ), Quezia Bezerra Cass² (PQ), Anita Jocelyne Marsaioli^{1*} (PQ) anita@iqm.unicamp.br

¹ Instituto de Química – UNICAMP – Brasil; ² Departamento de Química – UFSCar - Brasil

Palavras Chave: enantiosseletividade; high throughput screening; Quick-ee.

Introdução

A descoberta de novos biocatalisadores requer metodologias cada vez mais rápidas e sensíveis para investigação das especificidades das reações enzimáticas. Para tanto, métodos espectrofotométricos utilizando substratos cromogênicos ou fluorogênicos vêm sendo bastante empregados na obtenção da razão enantiomérica (E). No entanto, obter apenas valores de E consiste em um ponto de vista muito simplificado, pois, para um melhor entendimento do processo reacional, é importante avaliar os excessos enantioméricos (ee) e as conversões (c) separadamente. Vale ressaltar que alguns autores utilizam o er , sugerido por Gawley, para caracterizar reações enantiosseletivas, substituindo o ee tradicional². No entanto, em biocatálise, é mais comum utilizar ee como excesso enantiomérico e E como razão enantiomérica, sendo estas nomenclaturas as aplicadas neste trabalho. Neste contexto, este trabalho emprega o conceito de competição de Quick- E ^{1,3} com a sensibilidade dos ensaios com substratos fluorogênicos⁴, afim de obter separadamente os valores de ee e conversões, com uma nova metodologia agora denominada Quick- ee .

Resultados e Discussão

Para validação da metodologia de Quick- ee , foram selecionados: o micro-organismo *P. fluorescens* (CCT-7393) e uma lipase de *Aspergillus* (84205) com destacadas atividades enzimáticas nos ensaios de triagem de alto desempenho (*high throughput screening* - HTS)² frente à sonda fluorogênica **1** (Figura 1). Os ensaios de Quick- ee (com competição) e de ee_{estimado} (sem competição) foram realizados simultaneamente. Os ensaios foram monitorados por intensidade de fluorescência (RFU) durante 24 horas em espectrofotômetro (*FlashScan 530 Analytic Jena*, utilizando filtro de λ_{ex} 460 nm).

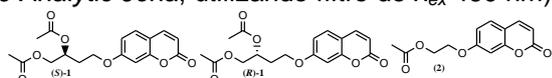


Figura 1. Sondas fluorogênicas ((*R*)-1 e (*S*)-1) e competidor (2) utilizados nos ensaios.

A escolha do competidor (2) utilizado nos ensaios de Quick- ee foi crucial para eficiência desta metodologia, pois, além de não ser fluorogênico, apresenta considerável semelhança estrutural com

as sondas utilizadas (Figura 1). Para validação desta metodologia, foram realizados ensaios de biocatálise convencional, os quais foram avaliados por HPLC utilizando uma coluna quiral CHIRALPAK-IC (Daicel: 25 cmx0.46 cm). As condições de análise foram: fase móvel - etanol/hexano (6:4), volume de injeção - 20 μL , vazão - 1.0 mLmin^{-1} e $\lambda_{\text{abs}}=320$ nm. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que os ensaios de Quick- ee apresentaram valores de ee mais próximos dos realizados por biocatálise convencional (avaliados por HPLC com coluna quiral), com desvios percentuais consideravelmente mais baixos quando comparados aos ensaios sem competição.

Tabela 1. Valores de ee obtidos nos ensaios com competição (Quick- ee), sem competição (ee_{estimado}) e por biocatálise convencional (ee_{real}).

Enzima / MO	C % a	ee_{estimado}^b	Quick - ee^b	ee_{real}^c	Desvio % (ee_{estimado})	Desvi o % (Quic k- ee)	Enantios- seletivo para
Lipase de <i>Aspergillus</i>	3 0	55	45	30	83.3	50.0	(<i>S</i>)-1
<i>P.</i> <i>fluorescens</i>	4	35	27	25	40	8	(<i>S</i>)-1

$$a) \text{ er} = \frac{(\text{RFU}_{\text{produto}} - \text{RFU}_{\text{substrato}})}{(\text{RFU}_{\text{produto}} + \text{RFU}_{\text{substrato}})} \times 100 \quad b) \text{ ee} = \frac{(\text{RFU}_{\text{produto}} - \text{RFU}_{\text{competidor}})}{(\text{RFU}_{\text{produto}} + \text{RFU}_{\text{competidor}})} \times 100 \quad c) \text{ ee} = \frac{(\text{RFU}_{\text{produto}} - \text{RFU}_{\text{competidor}})}{(\text{RFU}_{\text{produto}} + \text{RFU}_{\text{competidor}})} \times 100$$

O competidor comporta-se como o enantiômero correspondente e isto faz com que haja disputa pelo sítio ativo da enzima. Logo, os valores de ee obtidos nos ensaios com competição (Quick- ee) apresentam-se mais próximos do real, o que pôde ser confirmado com os resultados de HPLC com coluna quiral.

Conclusões

A metodologia de Quick- ee apresenta-se como uma alternativa prática e viável para investigação de ee em um grande número de amostras por unidade de tempo.

Agradecimentos

FAPESP, VALE, Petrobrás, CNPq; ao Prof. Ronaldo Aloise Pilli, Instituto de Química - UNICAMP, pela coluna de HPLC quiral.

¹ Mantovani, S. M.; Oliveira, L. G. e Marsaioli, A. J. *J. Mol. Catal. B - Enzim.* **2008**, 52-53, 173.

² Gawley, R. E. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2411.

³ Janes, L. E.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4560.

⁴ Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P. e Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4067.