

## Triagem de variáveis para a otimização do desempenho de uma epóxido hidrolase recombinante (AbEH) em meio bifásico

Bruna Z. da Costa (PG)<sup>1\*</sup>, Arnaldo F. da Silva (PG)<sup>1</sup>, Lilian L. Beloti (PQ)<sup>2</sup>, Anete P. Souza (PQ)<sup>2</sup>, Anita J. Marsaioli (PQ)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química – UNICAMP. CP 6154, CEP 13083-970, Campinas - SP.

<sup>2</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, UNICAMP, CP 6010, CEP 13083-875, Campinas-SP.

\*e-mail: brucosta@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: planejamento fracionário, epóxido hidrolase, AbEH, meio bifásico

### Introdução

Epóxido-hidrolases (EHs, EC 3.3.2.3) catalisam a hidrólise de epóxidos a seus respectivos dióis vicinais. Quimicamente, estas enzimas se destacam como biocatalisadores versáteis na resolução cinética de epóxidos racêmicos. Epóxidos e dióis enantiomericamente puros são valiosos intermediários sintéticos para a preparação de diversas moléculas biologicamente ativas.

No entanto, uma dificuldade enfrentada no uso de enzimas em síntese orgânica, é a baixa solubilidade dos substratos em meios aquoso. Assim, as reações em meio bifásico emergem como uma solução, promovendo a solubilização do substrato na fase orgânica e alocação da enzima na fase aquosa.

Neste enfoque, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variáveis que influenciam a atuação de uma epóxido-hidrolase de *Aspergillus brasiliensis* (AbEH), recombinante e expressa em *E. coli*, na hidrólise enantiosseletiva do óxido de estireno (SO) em meio bifásico, utilizando planejamento fracionário de experimentos.

### Resultados e Discussão

Neste trabalho foi realizado um planejamento fracionário  $2_{III}^{7-4}$ , utilizando as funções geradoras  $I = 124$ ,  $I = 135$ ,  $I = 236$ ,  $I = 1237$ . O planejamento consiste de oito experimentos, os quais foram iniciados simultaneamente. Foram também realizadas 3 repetições no ponto central para a estimativa dos erros experimentais. As variáveis e os níveis avaliados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Níveis do planejamento fracionário  $2_{III}^{7-4}$ .

Fatores	Níveis		
	-	0	+
[Enzima] (mg/mL)	0,4	0,6	0,8
[Substrato] (mg/mL)	2,0	3,5	5,0
% Solvente orgânico	50%	62,5%	75%
[Tween-20] (% v/v) <sup>a</sup>	0,1	0,3	0,5
Temperatura (°C)	28	31,5	35
pH	6	7	8
Tempo (h)	12	18	24

Os valores obtidos dos contrastes para as sete variáveis avaliadas estão contidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Contrastes obtidos a partir dos 11 experimentos do planejamento fracionário  $2_{III}^{7-4}$ .

Variáveis	Conversão (%)	ee (SO)
[Enzima]	11,23	3,01
[Substrato]	-2,26	-16,30
% Solvente orgânico	-9,56	-8,71
% Tween-20	-5,82	-7,93
Temperatura	-21,43	-33,21
pH	-23,67	-41,50
Tempo	1,28	22,44

O valor do erro nos contrastes é de 1,81% para a conversão e 6,20% para o ee. Para ambas as respostas obtidas observamos que a temperatura e o pH se destacaram como altamente significativos, sendo que os valores negativos indicam que menores níveis de temperatura e pH levam a maiores conversões e excessos enantioméricos. A maioria das variáveis avaliadas são significativas, no entanto, somente a temperatura e o pH caminham claramente na mesma direção e proporção para o incremento de ambas as respostas.

A maior conversão (54%) foi observada no experimento utilizando 0,8 mg/mL de enzima, 5 mg/mL de substrato, 50% de solvente orgânico, 0,5% de Tween-20, 28 °C, pH 6 e 12 h de reação.

### Conclusões

O planejamento fracionário desenvolvido permitiu selecionar a temperatura e o pH como as variáveis mais significativas para o incremento da conversão e da enantiosseletividade da hidrólise enzimática do óxido de estireno em meio bifásico. Um novo planejamento experimental será realizado com o intuito de otimizar estas respostas.

### Agradecimentos

FAPESP (2011/10378-0), CAPES, CNPq

<sup>1</sup>Lee, E.Y.; Schuler, M.L. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 318.

<sup>2</sup>Karboune, S.; Archelas, A.; Baratti, J. *Enz. Microbiol. Tech.*, **2006**, *39*, 318.