

Utilização de triagem de alto desempenho para detecção de epóxido hidrolases em microorganismos brasileiros.

Simone M. Mantovani (PG)¹, Lu Shi Chen (PG)¹, Luciana, G. de Oliveira (PQ)¹, Susan P. de Vasconcelos (PG)¹, Georgiana F. da Cruz (PG)¹, Anita J. Marsaioli (PQ)^{1*}. anita@iqm.unicamp.br

¹ Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, C. P. 6154, CEP: 13083-970, Campinas-SP.

Palavras Chave: epóxido hidrolases, triagem de alto desempenho.

Introdução

Dentre as metodologias instrumentais relatadas na literatura para a avaliação da atividade enzimática de biocatalisadores (enzimas ou microorganismos) a Triagem de Alto Desempenho (HTS) baseado em ensaios fluorogênicos¹ têm-se destacado, pois fornecem um grande número de respostas num curto espaço de tempo. A fim de monitorar atividades epóxido hidrolases de microorganismos brasileiros da coleção de culturas do laboratório de biocatálise e síntese orgânica (LABIOSIN-UNICAMP), foram realizados ensaios fluorogênicos, utilizando como substratos os epóxidos 1 e 2.

Resultados e Discussão

Os microorganismos foram avaliados segundo a metodologia descrita por Badalassi *et al.* (2000)² adaptadas à investigação de células microbianas íntegras³.

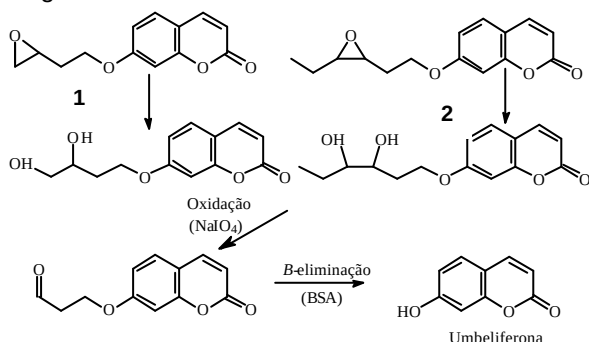


Figura 1. Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção de enzimas epóxido hidrolases.

Os ensaios foram monitorados por emissão de fluorescência durante 11 horas, através de espectrofotômetro (Flashscan 530 Analytic Jena), utilizando filtro de λ_{ex} 460 nm (Tabela 1).

Dentre os 39 microorganismos avaliados, somente 13 mostraram-se enzimaticamente ativos, sendo que as leveduras apresentaram maior intensidade de fluorescência em relação aos fungos.

Os melhores resultados foram detectados para a sonda que contém o epóxido 1,2-substituído, indicando uma preferência microbiana para esse substrato quando comparado ao epóxido 3,4-substituído.

Tabela 1: Ensaio de HTS para detecção de enzimas epóxido hidrolases em microorganismos brasileiros.

Microorganismos ^a	Intensidade de fluorescência (I. F.) ^b	
	Sonda 1	Sonda 2
<i>C. albicans</i>	1518	n.d.
<i>P. canadensis</i>	149	n.d.
<i>P. kluyveri</i>	150	n.d.
<i>P. stipis</i>	593	n.d.
<i>R. glutinis</i>	277	n.d.
<i>S. boulardii</i>	369	n.d.
<i>Sacharomyces</i> sp.	406	n.d.
<i>T. cutaneum</i>	325	n.d.
<i>C. utilis</i>	337	n.d.
<i>K. marxianus</i>	354	n.d.
<i>S. cerevisiae</i>	313	n.d.
<i>A. niger</i>	n.d.	236
Fungo 4964	131	188

^aConcentração da suspensão microbiana utilizadas no teste foi de 0,5mg/mL.

^b Valor= (I. F. das amostras)- (I. F. de controle negativo).

n.d.= Fluorescência não detectada.

Conclusões

Os microorganismos que apresentaram atividade para as sondas testadas serão avaliados por metodologias convencionais de biocatálise.

Agradecimentos

IQ-UNICAMP, FAPESP.

¹ Reymond, J-L. *Chimia* **2001**, 55, 1049-1052.

² Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4067.

³ Bicalho B, Chen LS, Grogmox J, Reymond JL, Marsaioli A. J. J. *Brazil. Chem. Soc.* **2004**, 15, 911-916.