

## Preparo de CLEA de Fosfolipase A<sub>2</sub> de veneno de Serpentes

Renan A. S. Pirolla (PG)<sup>1</sup>, Sérgio Marangoni (PQ)<sup>2</sup>, Paulo J. S. Moran (PQ)<sup>1</sup>, J. Augusto R. Rodrigues (PQ)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, CEP 13084-971, Campinas-SP, Brasil. Tel:+55-19-3788-3041; e-mail: [jaugusto@iqm.unicamp.br](mailto:jaugusto@iqm.unicamp.br)

<sup>2</sup>Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

Palavras-chave: Biocatálise, CLEA, Fosfolipase A<sub>2</sub>

### Introdução

O uso de enzimas na química orgânica como biocatalisadores vem aumentando nos últimos tempos. Isso se dá ao fato de oferecerem reações em condições mais brandas (como temperatura e pH fisiológicos, serem biodegradáveis e possuírem alta atividade e grande quimio-, regio- e estereoseletividade). Entretanto, a reutilização das enzimas se torna difícil devido à sua baixa estabilidade ao processo, que aliado ao fato de geralmente possuírem preço elevado, faz com que a procura de métodos de imobilização seja um dos objetivos da biotecnologia.

Existem diversos métodos de imobilização de enzimas, mas um vem recebendo grande atenção, o agregado com ligações cruzadas (Cross-Linked Enzyme Aggregate – CLEA). É um método muito simples, que consiste na ligação covalente cruzada de uma enzima precipitada (não é necessária a cristalização).

### Resultados e Discussão

O preparo dos CLEAs é feito e dissolvendo-se 0,5 mg da fosfolipase A<sub>2</sub> em 1 mL de tampão TRIS-HCl (10mM) pH 8.0. Após completa dissolução da enzima, adiciona-se 0,5 mL do precipitante, que é mantido por agitação magnética por 40 minutos, para formação do agregado enzimático. Quando o CLEA é feito com o adiconante, a enzima é dissolvida na presença de 10 mg de TRITON-X100 ou 0,5 mL de polietilenodiimina (PEI). Após a formação do agregado, é adicionado 100 µL de solução aquosa 25% de glutaraldeído. A reação é deixada a noite sob agitação à temperatura ambiente.

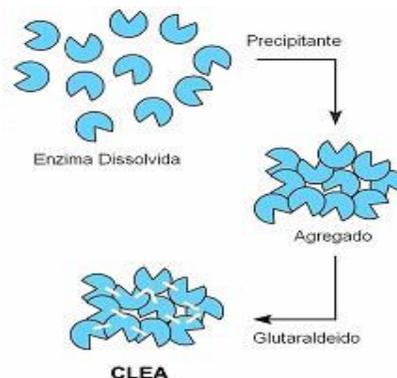
Então, a solução é centrifugada a 500 rpm, 18 °C e 10 minutos, o sobrenadante é retirado, o CLEA é re-suspenso em tampão TRIS-HCl e novamente centrifugado. Esse procedimento três vezes e o CLEA, guardado em geladeira.

As enzimas utilizadas no trabalho foram purificadas a partir do veneno das serpentes: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus coliligneatus*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*.

Os ensaios de atividade enzimática foram feitos utilizando a hidrólise do ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi)benzóico, monitorada por U.V. a 425 nm, seguindo Holzer e Mackessy.<sup>1</sup>

**Figura 1.** Formação do CLEA.

29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química



**Tabela 1.** Valores das Atividades dos Agregados quando comparados à enzima livre.

Precipitante	Adiconante	Atividade
Sulfato de Amônio	-	107%
	TRITON X-100	67%
	PEI	16%
PEG600	-	93%
	TRITON X-100	45%
	PEI	0%
DME	-	42%
	TRITON X-100	22%
	PEI	6%
Acetona	-	22%
	TRITON X-100	0%
	PEI	4%

A partir dos resultados, pode-se observar que o tipo de precipitante e adiconante influenciam na atividade do CLEA formado. Sendo os melhores resultados obtidos com Sulfato de Amônio (que ocorre hiperatividade) e PEG600, sem adiconante.

### Conclusões

Com as análises de atividade, pode-se observar hiperatividade do CLEA em sulfato de amônio, o que pode ser muito útil em reações de biocatálise.

### Agradecimentos

A FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

<sup>1</sup> Holzer, M. ; Mackessy, S. P. *Toxicon* **1996**, *34*, 1149-1155.