

Análise de cinética de hidrólise com lipase suportada através espectroscopia de fluorescência.

Denis Massucatto^{1*} (PG), Marcelo H. Gehlen¹ (PQ) – *mpmassuca@gmail.com

¹ Departamento de Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo - Av. Trabalhador Sancarlense 400, CEP 13560-970, Cx. Postal 780, São Carlos, SP

Palavras Chave: lipase, fluorescência, quinizarina, hidrólise, Novozym 435.

Introdução

As enzimas, catalisadores naturais de sistemas biológicos, são reconhecidas pelo elevado poder catalítico e alta especificidade. As enzimas são capazes de atuar tanto na reação direta quanto na inversa, aumentando o interesse comercial das mesmas. Dessa forma, uma avaliação da cinética das enzimas pode nos fornecer informações valiosas sobre o mecanismo de atuação e de taxas de conversão específicas das enzimas.

As lipases são enzimas que atuam no sistema digestório de organismos vivos e possuem atividade sobre ésteres. Há um interesse comercial notório nas lipases, para a fabricação de detergentes, produção de papel e celulose, tratamento de efluentes etc¹. No presente trabalho, propõe-se um novo método de ensaio que permite a investigação da cinética enzimática da lipase com o auxílio de um fluorímetro.

Resultados e Discussão

A sonda utilizada possui uma emissão de fluorescência característica, enquanto que seu derivado diacetilado não fluoresce (Figura 1). Este sistema é ideal para se realizar medidas cinéticas com o auxílio de um fluorímetro, utilizando-se como reagente o derivado não fluorescente que após hidrolisado forma a quinizarina altamente fluorescente (Figura 2).

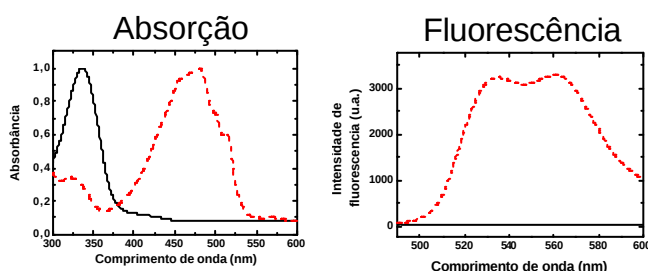


Figura 1. Espectros de absorção e emissão ($\lambda_{ex} = 400$ nm) da quinizarina (tracejada) e de seu derivado diacetilado (sólida).

A hidrólise foi realizada nas seguintes condições: 125 μ M de quinizarina diacetilada, 20mg de Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* suportada em partículas de poliacrilato) e 3mL de n-hexano, com temperatura em 32°C. As medidas de

fluorescência foram realizadas em um fluorímetro Edinburgh CD-900, com comprimento de onda de excitação fixado em 480 nm e os espectros de emissão foram medidos no intervalo de 500 a 750 nm com repetição de aquisição dos espectros a cada 5 minutos. Com a intensidade de cada espectro obtém-se a curva apresentada na Figura 3, que representa a formação da quinizarina em função do tempo.

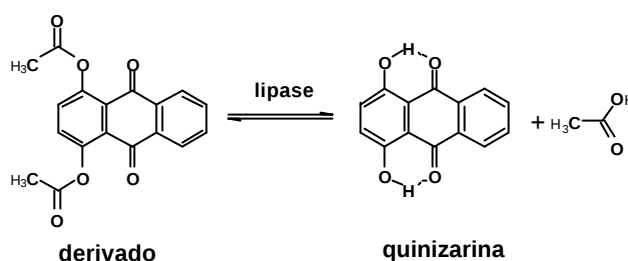


Figura 2. Reação de hidrólise.

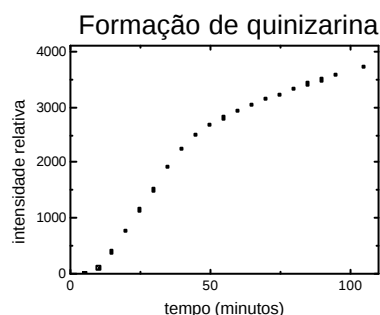


Figura 3. Perfil cinético da hidrólise.

Conclusões

Com esse novo método é possível monitorar a cinética de lipase por espectroscopia de fluorescência. Este também abre caminho para que se realizem experimentos utilizando a Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS, em inglês) que permite avaliar a cinética com resolução até de uma única molécula.

Agradecimentos

Ao IQSC pela infra-estrutura, ao CNPQ e à FAPESP pelas bolsas concedidas e à Novo Nordisk pelo fornecimento da enzima.

¹ Schmid, R.F. e Verger R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608-1633.