

Hidrólise de derivados da quinizarina catalisada por lipase monitorada por espectroscopia de fluorescência

Carolina Aparecida Sabatini (PG), Denis Massucatto (PG), Marcelo Henrique Gehlen (PQ)*

Grupo de Fluorescência Molecular – Departamento de Físico-Química – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos/SP.

*e-mail: marcelog@iqsc.usp.br

Palavras Chave: lipase, espectroscopia de fluorescência, quinizarina.

Introdução

As lipases têm aplicações em diversas áreas, tendo funções digestivas, catalisam quebra de ligações do tipo éster podendo acomodar diversos tipos de substratos, alifáticos, aromáticos e alicíclicos¹. A quinizarina é um fluoróforo que quando esterificado em seu grupo hidroxila, perde ligação de hidrogênio, tornando-se uma molécula não fluorescente, como ilustrado na figura 1.

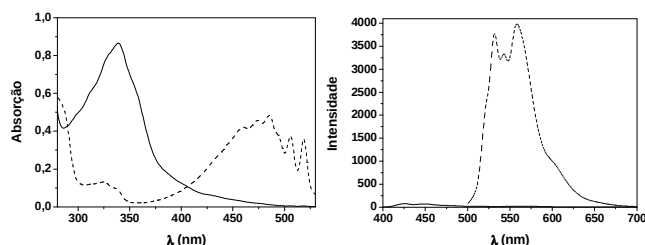


Figura 1: Espectros de absorção e fluorescência da quinizarina (--) e de seu derivado dibutil (-).

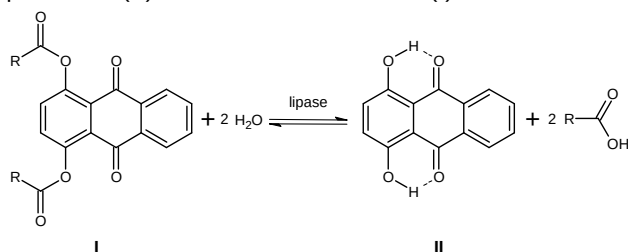


Figura 2: Esquema de reação catalisada pela lipase. (I) derivado; (II) quinizarina.

Resultados e Discussão

A reação de hidrólise é monitorada por fluorescência, após a adição da lipase suportada Novozyme[®] 435 na solução do derivado diesterificado, em n-hexano. A formação da quinizarina pode ser detectada pelo aumento da intensidade de fluorescência com o tempo. Integrando cada espectro e traçando os valores obtidos em função do tempo, observa-se um comportamento sigmoidal da curva representativa da cinética enzimática. Isto se deve ao fato de que a enzima acomoda somente um éster por ciclo catalítico. Foram realizadas medidas com os derivados dibutil e diacetil, porém somente resultados com o dibutil estão sendo ilustrados. Para o derivado diacetil os dados obtidos são semelhantes.

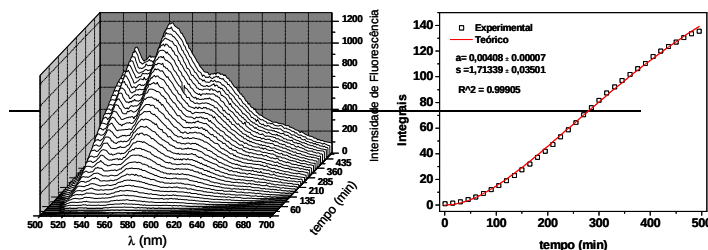


Figura 3: Acompanhamento da hidrólise do dibutil em n-hexano e simulação teórica dos resultados experimentais.

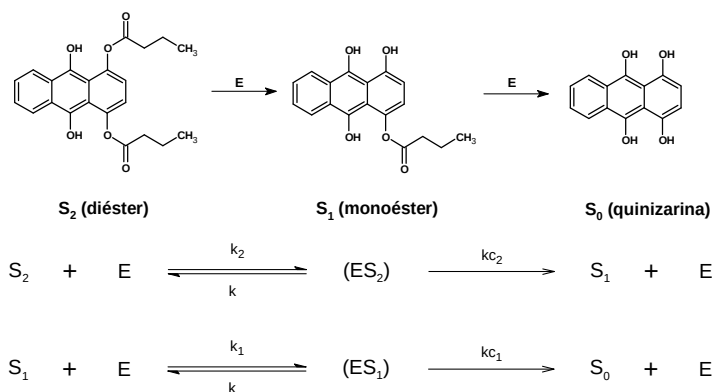


Figura 4: Modelo cinético para a reação de hidrólise.

Considerando o estado estacionário para as espécies (ES_2) e (ES_1) , obtém-se uma solução analítica, da qual é possível estimar as constantes cinéticas envolvidas na reação.

$$S_0(t) = S_2^0 (1 - e^{-\alpha Et} (\alpha Et + 1)) \quad \alpha = -k_2 + \frac{k_{-2}}{K_{M2}}$$

Conclusões

O método mostrou-se eficiente para avaliar a cinética enzimática. Os valores estimados para as constantes dos derivados dibutil e diacetil foram $3,83 \text{ Lmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $30,3 \text{ Lmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Esta diferença se deve, provavelmente, pela diferença no volume hidrodinâmico dos derivados. Mas para generalizar esta tendência ainda é necessário estudar derivados de cadeias mais longas.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq, CAPES e Novozymes.

¹Sharma, R. et al. *Bioch. Adv.* **2001**, 19, 627.