

OBTENÇÃO DE SUPORTES HÍBRIDOS DE SÍLICA-MONOSSACARÍDEOS, COM POSSÍVEL UTILIZAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE.

Ivan Martins Barreto¹; Heiddy Márquez Alvarez²; Maria Antônia Carvalho Lima de Jesus³.

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

ivanmartins@yahoo.com.br

2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

marquezheiddy@gmail.com

3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

airamcarvalho@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: imobilização; suporte híbrido; monossacarídeos.

INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas em suportes híbridos mesoporosos (orgânico e inorgânico) atualmente apresenta um grande potencial, devido as melhores características do material quando comparadas a seus componentes separadamente. A síntese destes suportes híbridos pode ser realizada através da funcionalização pós-sintética (enxerto), a co-condensação ou na forma de organosílicas mesoporosas (ADAM et al., 2012).

Diversos suportes inorgânicos de sílicas mesoporosas como, por exemplo, as sílicas SBA-15 e MCF já foram utilizados para a imobilização de peroxidase de raiz forte ou *horseradishperoxidase* (HRP), que é uma enzima de grande interesse em virtude das inúmeras possibilidades de aplicação (CAO et al., 2012). A HRP livre e/ou imobilizada apresenta diversas aplicações que unidas à sua elevada atividade, simplicidade na detecção e relativa estabilidade motiva o desenvolvimento de novos biocatalisadores que aumentem a estabilidade da mesma. Contudo a HRP possui um alto preço no mercado. A peroxidase de rabanete (*Raphanus sativus*) – RAP possui estrutura semelhante a HRP e pode ser utilizado como fonte alternativa de peroxidases. Considerando os estudos sobre imobilização de peroxidase extraída de rabanete (*Raphanus sativus*), verificou-se que não existem relatos na literatura quanto ao uso de suportes híbridos (inorgânico e orgânico) possibilitando um novo estudo que abarque a obtenção de novos suportes para a imobilização de enzimas econômicas com diversas aplicabilidades.

METODOLOGIA

Extração da enzima do rabanete

A enzima foi extraída das raízes do rabanete (*Raphanus sativus*) comprado no comércio local. As raízes foram lavadas com água e tiradas à pele e cortadas em pedaços pequenos. Utilizamos 30,0 g das raízes trituramos e homogeneizamos em um triturador com 100 mL de tampão fosfato (0,05 mol/L) pH 6,5 por 30 segundos. Adicionamos 65 % (v/v) de acetona fria à mistura obtida anteriormente, até precipitação da enzima. A mistura foi armazenada na temperatura de congelamento (-18 °C) por 24 horas. Após este tempo, fizemos a centrifugação da mistura a 4 °C por 15 min. O precipitado contendo a peroxidase foi coletado e submetido à remoção da acetona por evaporação em banho gelado por 24 horas e após foi liofilizada, sendo então utilizada para os testes de imobilização (CHAGAS, 2014).

Síntese de suportes híbridos de sílica e monossacarídeo

A obtenção dos suportes híbridos foi realizada utilizando a metodologia dos suportes das sílicas SBA-15 e MCF modificada (CHOUYYOK *et al.*, 2009). Utilizamos a glicose e a frutose como o aditivo orgânico (AD) e o tetraetilortosilicato (TEOS) como a parte inorgânica. Para o preparo dos suportes híbridos de sílica SBA-15 modificado, utilizamos 0,5 ou 1,0 g do monossacarídeo, em 30 mL de água destilada e 585 µL de ácido clorídrico concentrado (HCl). Em seguida, 5 mL de TEOS foram adicionados à solução. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a completa homogeneização. A mistura foi colocada em um sistema reacional com banho de óleo de silicone, acoplado a um condensador de refluxo e permaneceu a 80 °C durante 24 horas. A mistura obtida ao final do processo foi filtrada e lavada com água destilada até o pH neutro. O material sintetizado foi seco à temperatura ambiente por 24 horas e armazenado. A quantidade de monossacarídeo que não reagiu foi determinada pelo método Lane e Eynon, conforme Tavares *et al.* (2010), no qual utilizamos o fluído oriundo da reação, obtido na filtração do sólido obtido.

Imobilização da peroxidase por Adsorção física (AF)

A RAP e a HRP foram imobilizadas por adsorção física (AF) em híbridos de sílica SBA-15 modificada. A imobilização foi conduzida em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM, pH 7,0, meio que propicia maior eficiência de imobilização conforme a literatura. O efeito do carregamento da enzima na faixa de 0,10 - 0,5 mg de enzima/g de suporte foi avaliado para imobilização da RAP e HRP nos suportes sintetizados.

Na metodologia de imobilização por adsorção física (AF) o suporte seco foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato e mantido sob agitação mecânica por 15 minutos, em seguida foi adicionado 1 mL da solução de RAP ou de HRP (0,1 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 no carregamento de enzima desejado. O sistema foi mantido em um shaker sob agitação de 150 rpm por 3 horas a 30 °C, em seguida, foi armazenado a 4 °C em condição estática, durante 24 horas. Finalmente, o biocatalisador, suporte com a enzima adsorvida, foi filtrado e lavado com tampão para retirada de enzimas não adsorvidas até o volume de 6 mL e o filtrado foi reservado para quantificação da atividade enzimática.

Determinação da atividade peroxidásica

A atividade enzimática de RAP e da HRP foi determinada conforme o método de utilizado por Hirata *et al.* (1998) que é baseado na mudança de absorvância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol durante três minutos (tetraguaiacol: $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O ensaio contém 2,75 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0); 0,05 mL da solução enzimática, diluída quando necessário, em tampão pH 7,0; 0,1 mL de solução de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,0 mM a 25 °C. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de fornecer 1 µmol de produto em 1 minuto a 25 °C em pH 6,0.

A eficiência de imobilização (%) e o número de unidades de enzima imobilizada (U) foram determinados pela diferença entre número de unidades de atividade peroxidásica oferecidas (U_0) e o número de unidades de enzima remanescente no filtrado (U_f), conforme Eq.

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \frac{(U_0 - U_f)}{U_0} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese dos suportes híbridos silicato-monossacarídeo ocorreu de forma satisfatória. Foram obtidos quatro suportes, utilizando glicose e frutose como aditivo orgânico (AO), Figura 1.

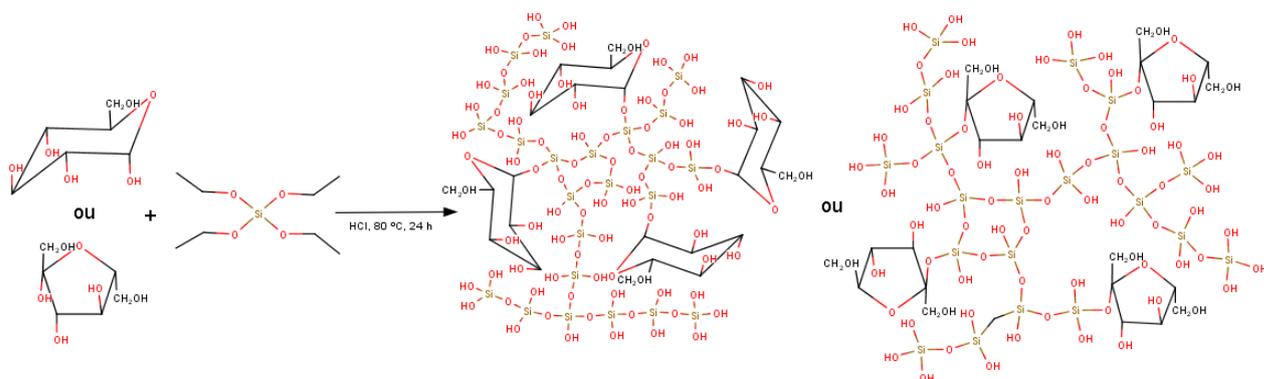


Figura 1. Reação de síntese do suporte híbrido sílica-monossacarídeo.

A determinação da quantidade de monossacarídeo que não reagiu foi determinado pelo método de Lane e Eynon. Os resultados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos na síntese dos suportes híbridos sílica-monossacarídeo.

Suporte	AO	% de AO no suporte	Massa de suporte obtida (g)
GA	Glicose (1,0 g)	35,3	1,86
FA	Frutose (1,0 g)	34,9	1,88
GB	Glicose (0,5 g)	49,8	1,86
FB	Frutose (0,5 g)	59,0	1,97

Na tabela 1 se observa que a quantidade de aditivo orgânico não influencia na massa de suporte obtida, no entanto se influencia na quantidade de monossacarídeo presente no suporte.

A RAP foi substituída pela HRP, pois apresentou baixa atividade, o que pode ser justificado pela desnaturação parcial da enzima no processo de extração ou durante o manuseio do extrato bruto.

A HRP foi imobilizada por adsorção física (AF) no suporte híbrido silicato-monossacarídeo do tipo A. O efeito do carregamento de HRP (1 – 5 mg de HRP/g de suporte) na imobilização da HRP em suporte híbrido por AF é mostrado nas Figuras 1 e 2.

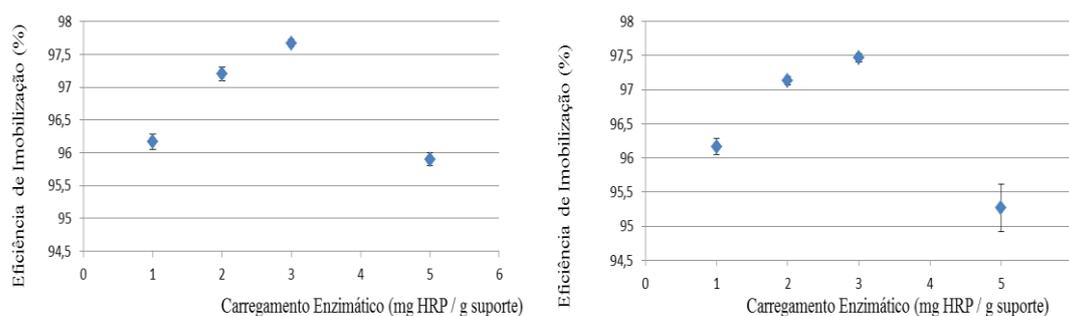


Figura 2. Eficiência de imobilização no suporte GA e no suporte FA, respectivamente.

As Figuras acima mostram que no método de imobilização por AF usando o suporte híbrido A, apresentou um aumento, relativamente pequeno, na eficiência de imobilização com o aumento no carregamento, no intervalo de 1 a 5 mg de HRP/g de suporte, assim concluímos que o carregamento enzimático tem pouca influência na eficiência de imobilização.

A imobilização de HRP por AF foi estudada por Queiroz et al. (2014) utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como suporte e por Jesus et al. (2017) utilizando suporte híbrido alginato-silicato. Para o primeiro a eficiência de imobilização foi constante, em torno de 30 %, com carregamento entre 0,125 e 2 mg de HRP/g suporte, e em carregamento superior (2,5 mg de HRP/g suporte) ocorreu uma diminuição na eficiência para 19 % e o segundo concluiu que a melhor eficiência de imobilização foi no carregamento de 2 mg de HRP / g de suporte. Contudo, os suportes em análise apresentaram maior eficiência de imobilização no carregamento de 3 mg de HRP / g de suporte, sendo 97 % de eficiência no suporte tipo GA e no suporte tipo FA e decaindo para 95 % no carregamento de 5 mg HRP / g de suporte em ambos biocatalisadores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantidade de aditivo orgânico utilizado na síntese do suporte híbrido influencia diretamente na quantidade de monossacarídeos presente no filtrado, contudo não influencia na quantidade de suporte obtida, desta forma, é possível usar menores quantidades de aditivos orgânicos, a fim de evitar a produção de volumes maiores de rejeitos. A eficiência de imobilização da enzima HRP no suporte híbrido mostrou-se satisfatória. Os valores de eficiência mostraram-se crescentes até o limite de saturação do suporte. O carregamento de 3 mg de HRP/g suporte foi considerado ideal para imobilização do suporte em estudo.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F.; APPATURI, J. N.; IQBAL, A. The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress, *Catalysis Today*, 190, p. 2 - 14, 2012.
- CHAGAS, P. M. B. Estabilidade catalítica da peroxidase de nabo na forma livre e imobilizada em esferas de quitosana. Lavras. UFLA, 2014.
- CAO, S; AITA, G.M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactante and dilute ammonia treated sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, 131, p. 357–364, 2013.
- CHOUYYOK, W.; PANPRANOT, J.; THANACHAYANANT, C.; PRICHANONT, S. Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, p. 246 - 252, 2009.
- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotianatabacum*, *Tetrahedron*, 54, p. 15993 - 16003, 1998.
- JESUS, M. A. C. L; Imobilização da peroxidase de raiz forte (HRP) em suporte híbrido sílica-alginato e em amberlite IRA 67 impregnada com íons cobre: potencialidades do biocatalisador imobilizado na biodegradação do corante índigo carmim. *Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana*. Feira de Santana – BA. 2017.
- QUEIROZ, M. L. B. Imobilização de Peroxidase de raiz forte por adsorção física e ligação covalente em bagaço de cana de açúcar. *Dissertação de Mestrado - Biotecnologia Industrial*. Aracaju - SE, 2014.
- TAVARES, J. T. Q.; CARDOSO, R. L.; COSTA, J. A.; FADIGAS, F. S. F.; FONSECA, A. A. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 4, 805-809, 2010.