

SUPORTES HÍBRIDOS UTILIZADOS NA IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DE RAIZ FORTE – HRP.

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; HRP.

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).

O método da co-condensação utiliza moléculas orgânicas como agentes moldes para a estrutura do material, onde ocorre a condensação do precursor na estrutura. Assim, esse método é bastante utilizado para a obtenção de suportes híbridos de sílica mesoporosos.

O processo de imobilização pode ser realizado utilizando diferentes técnicas. Os métodos de adsorção física (ADS) e de ligação covalente (LC) são os mais utilizados. Segundo Singh e colaboradores os métodos por adsorção física e ligação covalente podem reduzir ou evitar a lixiviação da enzima. A enzima pode-se ligar ao suporte orgânico ou inorgânico através de interações adicionais covalentes ou não covalentes, que ocasiona na diminuição da flexibilidade estrutural da enzima e uma maior rigidez a enzima imobilizada, reduzindo a possibilidade de desnaturação (Singh *et al.*, 2013).

A peroxidase de raiz forte ou horseradish peroxidase (HRP) apresenta diversificadas aplicações na indústria, desde a descoloração de corantes sintéticos até o desenvolvimento de biossensores (Mohamed *et al.*, 2013), na área clínica e ambiental. Estas possibilidades de aplicação unidas à sua elevada atividade, simplicidade na detecção de produtos e relativa estabilidade leva a desenvolver novos métodos ou suportes que aumentem a estabilidade desta enzima. Suportes inorgânicos de sílicas mesoporosas como, por exemplo, as sílicas SBA-15 e MCF já foram utilizados para a imobilização da HRP com bons resultados (Cao et al., 2013). O objetivo deste trabalho foi desenvolver suportes híbridos que apresentem em sua composição sílica e alginato de sódio com posterior aplicação na imobilização de HRP por ADS e LC.

METODOLOGIA

Síntese do suporte híbrido de alginato-sílica

A obtenção dos suportes híbridos foi baseada na metodologia dos suportes das sílicas SBA-15 e MCF (Chouyyok et al., 2009). Usamos o aditivo orgânico alginato de sódio que foi utilizado na proporção de 5% (m/v). Para o preparo dos suportes híbridos de sílica SBA-15, dissolvemos 1,4 g de alginato de sódio em 4 g de pluronic P127, 30 g de água destilada e 120 g de HCl (2 M). Em seguida, 7,97 g de TEOS. A solução manteve-se sob agitação à temperatura ambiente até sua completa homogeneização, em seguida foi aquecida, com refluxo, a 80 °C durante 24 horas. As partículas obtidas foram

filtradas e lavadas com água destilada até o pH neutro. O material sintetizado foi seco à temperatura ambiente por 24 horas.

Uma parte do suporte obtido foi utilizado diretamente para a imobilização da HRP, outra parte foi direcionada para a impregnação com o sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e posterior imobilização da HRP e uma terceira porção para ser calcinado a $500\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 horas, antes de ser utilizado para a imobilização da HRP. Na impregnação com o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ utilizamos 5,0 g do suporte e 20 mL de uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de concentração 0,03M e 0,3M. A mistura de reação foi mantida sob agitação por 15 minutos num shaker. Após esse período, ocorreu a filtração e secagem do suporte a 60°C para posterior imobilização da enzima.

Imobilização da HRP no suporte

A imobilização da HRP foi conduzida em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM pH 8,0, meio que propicia maior eficiência de imobilização conforme a literatura. O efeito do carregamento de HRP no suporte híbrido foi na faixa de 0,125 - 3 mg de HRP/g de suporte. O sistema foi mantido sob agitação por 3 horas a $25\text{ }^\circ\text{C}$, em seguida, armazenado a $4\text{ }^\circ\text{C}$ em condição estática, durante 24 horas. Finalmente, o biocatalisador imobilizado foi filtrado e lavado com tampão para retirada de enzimas não adsorvidas e o filtrado foi reservado para quantificação da atividade enzimática.

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da HRP foi determinada por método colorimétrico, baseado na mudança de absorvância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol durante três minutos (ϵ tetraguaiacol: $26,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) ((Hirata *et al.*, 1998). O ensaio contém 2,76 mL de tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM (pH 6,0); 0,04 mL da solução enzimática diluída 200 vezes em tampão pH 6,0; 0,1 mL de solução de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,0 mM a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de fornecer 1 μmol de produto em 1 minuto a $25\text{ }^\circ\text{C}$ 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 a equação.

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

Os suportes foram caracterizados por técnica de espectroscopia de infravermelho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HRP foi imobilizada por ADS em suporte híbrido alginato-silicato. O efeito da impregnação do íon cobre (II) nos suportes sobre a eficiência de imobilização foi avaliado utilizando duas concentrações do metal (0,03M; 0,3M).

O efeito do carregamento de HRP (0,125 – 3,0 mg de HRP/g de suporte) na imobilização da HRP em suporte híbrido alginato-silicato por ADS é mostrado na Figura 2.

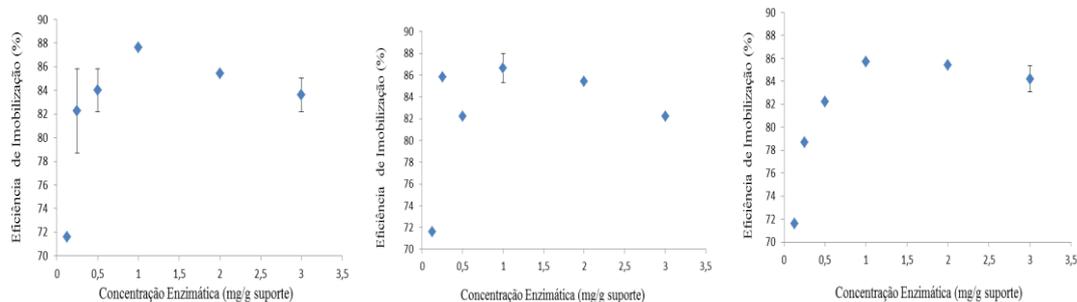


Figura 2: Gráfico da Eficiência de Imobilização da HRP em suporte híbrido alginato-silicato sem calcinar (SH): A) Branco; B) impregnado com o íon Cu^{2+} (0,03M); C) impregnado com o íon Cu^{2+} (0,3M) As Figuras acima mostram que no método de imobilização por ADS usando o suporte híbrido alginato-silicato, teve um aumento na eficiência de imobilização com o aumento no carregamento no intervalo de 0,125 a 1,0 mg de HRP/g de suporte e para um carregamento superior (2,0 e 3,0 mg de HRP/g suporte) ocorreu uma diminuição na eficiência. Esse mesmo comportamento pode ser observado para o suporte híbrido alginato-silicato na presença de íons cobre (II). Isso mostra que houve uma afinidade da enzima pelo suporte e essa interação foi proporcional à concentração da enzima. Com os carregamentos (2,0 e 3,0 mg HRP/ g suporte) nota-se uma redução na eficiência de imobilização atribuído provavelmente à sobrecarga de enzima no suporte que leva à limitações difusionais para o substrato (Mohamed et al., 2013). A presença do íon Cu^{2+} nos suportes não influenciou de forma significativa na eficiência de imobilização.

Gulay e Mohamed (2012) ao imobilizarem esterase em híbrido de sílica e alginato testaram quatro concentrações de enzima (0,01; 0,1; 0,5 e 1 mg/mL) na eficiência de imobilização. A concentração de 0,1mg/mL apresentou melhor eficiência (68,5%), acima dessa concentração, o suporte em estudo apresentou saturação.

Os resultados mostram que o carregamento de 1,0 mg de HRP/g suporte é considerado ideal para imobilização de HRP por ADS em híbrido alginato-silicato. Os valores para as eficiências de imobilização foram: Branco: (88,8%); híbrido- Cu (II) 0,03M (88,0%) e híbrido- Cu (II) 0,3M (87,2%).

A enzima HRP também foi imobilizada no suporte híbrido alginato-silicato calcinado (SHC). Os resultados para eficiência de imobilização e a atividade no imobilizado se apresentam na Tabela 1.

Tabela 1: Eficiência de Imobilização da HRP e Atividade Enzimática no Imobilizado em suporte híbrido Alginato/sílica com um carregamento de 10 mg HRP/ g suporte.

| Suporte | Eficiência de Imobilização(%) | Atividade no imobilizado |
|---------|-------------------------------|--------------------------|
| SHC | 57 | $1,8 \times 10^{-4}$ |
| SH | 60 | $1,9 \times 10^{-4}$ |

De acordo com a Tabela 1, observa-se que o valor para a eficiência de imobilização do híbrido calcinado e sem calcinar foram próximos e bem baixo quando comparado com aos carregamentos estudados anteriormente (0,125mg HRP - 3 mg HRP/g suporte). Isso mostra que muita enzima ficou no filtrado devido a saturação do suporte. Para o carregamento de 10mg HRP/ g suporte houve atividade enzimática no imobilizado.

A análise dos espectros de infravermelho dos suportes sintetizados nos ajudou a elucidar as possíveis estruturas destes suportes. Nos espectros de infravermelho se observa a mudança de várias bandas correspondentes à vibração de valência O-H e C=O. O que corrobora a ligação do silicato com as moléculas do alginato através do grupo carboxilato.

Vale lembrar que para a confirmação da estrutura de cada suporte seria necessário a utilização de outro método de caracterização, a saber: difração de raio X (DRX), análise termogravimétrica (TGA) ou microscopia eletrônica de varredura (MEV). Atualmente

as amostras estão sendo caracterizadas por TGA na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estamos fazendo uma parceria com o instituto de Química da UFBA para realizar as análises de DRX e MEV. Na figura 4, se mostra uma proposta da estrutura dos suportes SH e SHC.

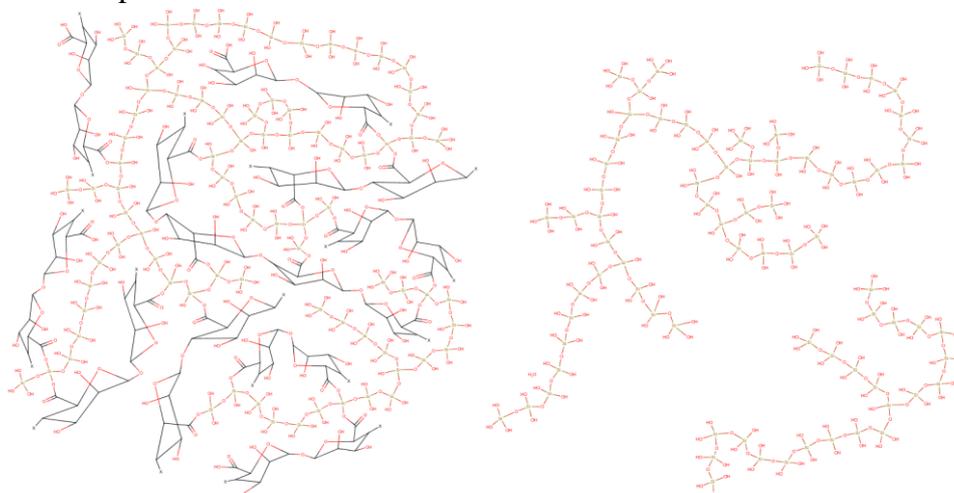


Figura 4: A) Proposta da estrutura do SH. B) Proposta da estrutura do SHC

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 a partir do qual esses valores começaram a declinar. O carregamento de 1 mg de HRP/g suporte foi considerado ideal para imobilização do suporte em estudo. O íon Cu^{2+} não influenciou na eficiência de imobilização e na atividade do biocatalisador híbrido. Os biocatalisadores híbridos silicato-alginato não apresentaram atividade enzimática exceto para um carregamento de 10mg HRP/g suporte.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F.; APPATURI, J. N.; IQBAL, A. 2012. The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress, *Catalysis Today*, 190, p. 2 - 14.
- CAO, S.; AITA, G.M. 2013. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactante and dilute ammonia treated sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, 131, p. 357–364.
- CHOUYYOK, W.; PANPRANOT, J.; THANACHAYANANT, C.; PRICHANONT, S. 2009. Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, p. 246 - 252.
- GULAY, S.; MOHAMED, G. S. 2012. Immobilization of thermoalkalophilic recombinant esterase enzyme by entrapment in silicate coated Ca-alginate beads and its hydrolytic properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, p. 545– 551.
- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. 1998. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotiana tabacum*, *Tetrahedron*, 54, p. 15993 -16003.
- MOHAMED, S.A.; DARWISHA, A.A.; EL-SHISHTAWY, R.M. 2013. Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 649 - 655.
- SINGH, R.K.; TIWARI, M.K.; SINGH, R.; LEE, J. 2013. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, p. 1232 - 1277.