

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE RAIZ FORTE (HRP) APRESENTA DIVERSIFICADAS APLICAÇÕES, EM SUPORTES HÍBRIDOS DE SÍLICA-POLISSACARÍDEO (AMIDO).

Ariana Sousa da Conceição¹; Heiddy Marquez Alvarez²; Ivan Martins Barreto³.

1. Ariana Sousa da Conceição, Graduando em licenciatura em química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: arianasousa0077@hotmail.com

2. Heiddy Marquez Alvarez, DEXA, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:marquezheddy@gmail.com

3. Ivan Martins Barreto, DEXA, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ivanmartins@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: peroxidase, suporte híbrido e imobilização enzimática.

INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas em suportes híbridos mesoporosos (orgânico e inorgânico) possui um grande potencial devido a que apresenta melhores características, quando comparadas a enzima livre. A síntese destes suportes pode ser feita pelo método de co-condensação a partir da utilização de aditivo inorgânico- tetraetil ortosilicato (TEOS) e como aditivo orgânico o amido, na presença de ácido clorídrico à temperatura entre 80-95°C.

O amido é um polissacarídeo de origem vegetal, biodegradável, biocompatível cujo não apresenta toxicidade. Ele é constituído por polímeros de amilase e de amilopectina, unidos por ligações glicosídicas alfa da glicose. Por suas características químicas, bem como fácil de obtenção, o amido é utilizado em indústrias alimentícias como espessante, e na indústria farmacêutica como aglutinante nos processos de granulação, como diluente, desintegrante, entre outros. O mesmo pode ser quimicamente modificado através de derivações, como a reticulação, a eterificação, a esterificação e o enxerto de grupos funcionas em sua estrutura. (SAKEER *et al.*, 2017)

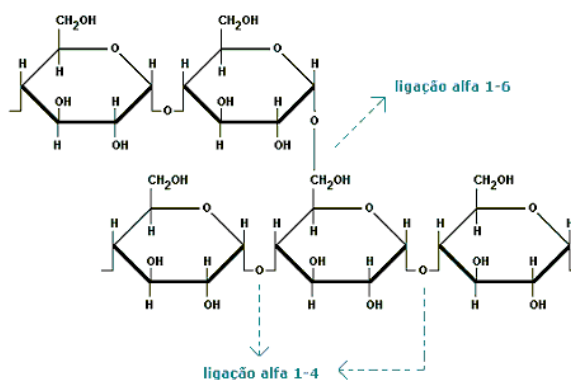


Figura 1. Estrutura do amido.

A estrutura química do amido facilita a obtenção de suportes híbridos insolúveis que sirvam para imobilizar enzimas. Uma das técnicas mais utilizadas no processo de imobilização de enzimas é a adsorção física. Este método se baseia na bioafinidade enzima-suporte, figura 2.

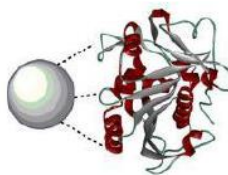


Figura 2. Imobilização por adsorção física, modificado de (SINGH *et al.*, 2013).

Segundo Singh e colaboradores o método por adsorção física pode 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, o 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).

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA:

MATERIAL:

Enzima peroxidase da TOYOBO, guaiacol, tetraetoxisilano (TEOS) amido comercial, solventes de interesse se encontram no LAPRON e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio 30 % (solução aquosa) (Vetec Química, RJ, Brasil).

METODOLOGIA:

Síntese de suportes híbridos de sílica:

O processo da síntese dos suportes híbridos silicato-amido comercial, foi baseado na metodologia descrita por Álvarez *et al.* (2017) com algumas modificações. Nos quais serão gerados suportes híbridos com diferentes massas de amido comercial (1,0 g; 0,5 g e 0,1g). Esse aditivo orgânico será dissolvido em 30 mL de água destilada, logo após adicionará 1,7 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl, 36%) e 5,0 mL de tetraetilortossilicato (TEOS). todo esse material será depositado em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, durante 24 horas sendo aquecida por um banho de silicone entre 80 a 95°C, depois desse período será resfriado em um banho de gelo, filtrado numa bomba a vacuo, lavado até atingir o pH neutro, secado, tritrado e armazenado, o filtrado foi guardado para ser quantificado.

Determinação do percentual de glicose residual.

A quantidade de monossacarídeo residual foi determinada pelo método Lane e Eynon, que consiste na redução dos íons cobre (II) presentes em uma solução alcalina.

Imobilização da peroxidase por Adsorção física (AF):

Se pesará 0,1g do suporte, logo em seguida se adicionará 1mL do tampão fosfato de sódio pH 7,0. E várias concentrações da enzima peroxidase da TOYOBO (0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 0,3mg/mL). Eles serão levados a agitação por 3 horas a 30 °C. Logo após será armazenado a 4 °C em condição estática, durante 24 horas. Finalmente, o biocatalisador imobilizado vai ser filtrado e lavado com tampão retirando as enzimas não adsorvidas e o filtrado reservado para quantificação da atividade enzimática.

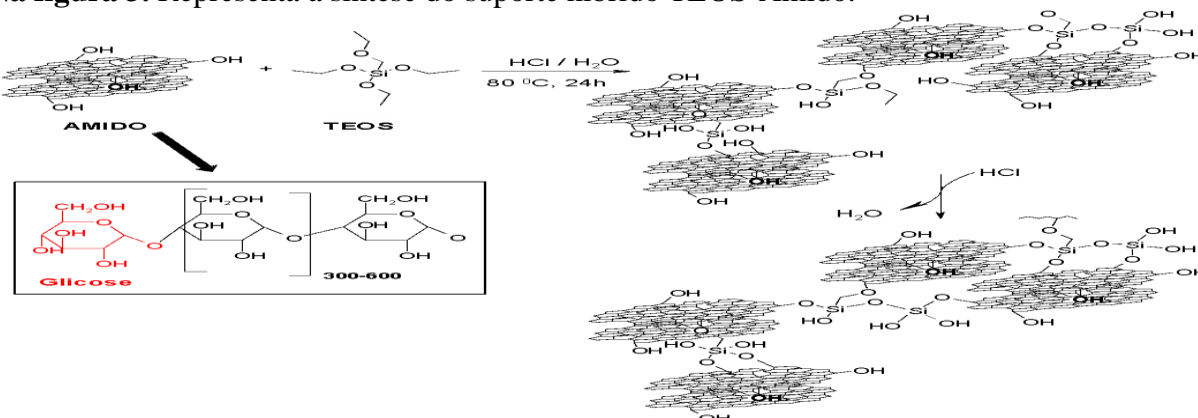
Caracterização do suporte de imobilização:

Os suportes foram caracterizados por técnica de técnicas de Infravermelho (FT-IR) e Análise Termogravimétrica (TGA).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO:

A enzima foi extraída das raízes do rabanete apresentou baixa atividade, por isso resolveu utilizar a peroxidase de raiz forte – HRP da empresa TOYOBO.

Na figura 3. Representa a síntese do suporte híbrido TEOS-Amido.



Inicialmente houve certas dificuldades para sintetizar os suportes híbridos (Sílica-Amido comercial), devido à variação de temperatura. Que por sua vez, pode ultrapassar dos 95 °C. Um aumento brusco da temperatura ocasiona a hidrólise do polissacarídeo (amido) em unidades de glicose que posteriormente em meio ácido degradam a ácido leulílico e ácido fórmico, figura 2. Após várias tentativas de controle da temperatura foi possível obter bons resultados na síntese do suporte.

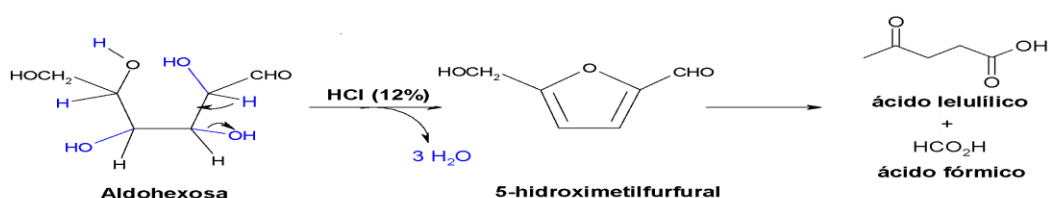


Figura 4. Degradação de glicose em meio ácido.

O processo da síntese dos suportes híbridos silicato-amido comercial, foi baseado na metodologia descrita por Álvarez et. al. (2017) com algumas modificações.

Os suportes gerados possuíam a coloração branco/ transparente (anexos 7 -9) isto condiz com o que está descrito na literatura (BARRETO 2018). Uma cor branca no suporte indica que não teve processo de polimerização-degradação do polissacarídeo.

A quantidade de glicose residual foi determinada pelo método Lane e Eynon. A reação consiste na redução dos íons cobre (II) a cobre (I) presentes em uma solução alcalina pela ação da glicose que é uma aldohexosa redutora.

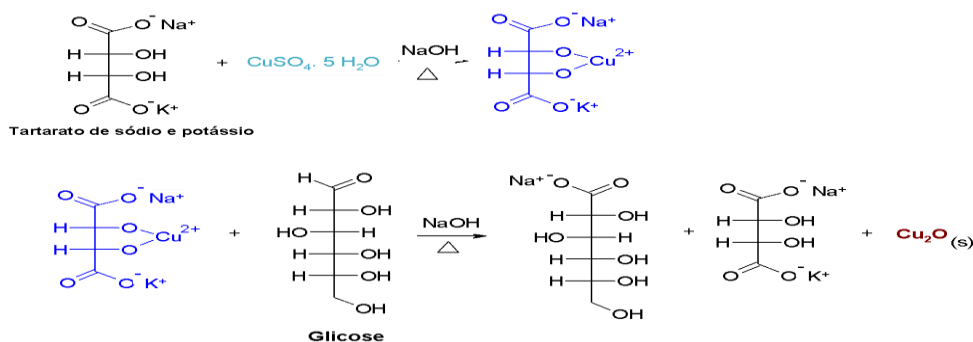


Figura 5: Reação envolvida no método de Lane e Eynon.

Na tabela 1 se apresentam os resultados obtidos a quantidade de glicose residual presente nas águas do filtrado da síntese dos diferentes suportes híbridos.

Tabela 1. Quantificação da massa do suporte híbrido e do % de glicose residual

Suporte	Massa do amido (g)	% glicose	Massa de suporte obtida (g)
Amido A	1,0	64,9	1,8092
		62,1	1,7729
Amido B	0,5	46,3	1,898
		45,8	1,8293
Amido C	0,1	31,2	1,4673
		22,9	1,3721

Na tabela 1 podemos observar que a quantidade de amido comercial não influencia na massa do suporte. Em relação % glicose redutor residual, observa-se que para 1,0 g do amido comercial, obteve aproximadamente em média 63% de glicose residual. Na medida que vai diminuindo a quantidade do amido utilizado na formação dos suportes híbridos diminui também a percentagem de glicose residual. Sendo que para 0,5 g de amido se encontra a média de 46% e para 0,1 g de amido teremos 27% de glicose residual. Todavia analisando os valores encontrados é notável que é melhor utilizar menor massa de amido para que não ocorra perda da matéria prima, uma vez que, não existe uma variação significativa na quantidade do material sintetizado.

Imobilização da HRP

Foi realizado a imobilização dos três suportes utilizando 0,1g do mesmo e várias concentrações da enzima peroxidase da TOYOBO (0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 0,3mg/mL). No momento em que se foi fazer a análise espectrofotométrica para calcular a eficiência de imobilização verificou-se valores negativos nas absorvâncias, no que indica que houve erros na manipulação ou do preparo de alguma das soluções, portanto essa parte do experimento terá que ser refeita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Foram sintetizados 3 suportes com diferentes quantidades de amido comercial (1,0g; 0,5g; 0,1g), mantendo a mesma quantidade de TEOS (aditivo inorgânico).

A quantidade de amido comercial, não interferiu na massa gerada do produto final (suporte híbrido).

Não foi possível determinar a eficiência da atividade enzimática peroxidásica que serão refeitas.

REFERÊNCIAS:

- ADAM, F.; APPATURI, J. N.; IQBAL, A. **The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress**, *Catalysis Today*, 2012.
- SAKEER, K; SCORZA, T.; ROMERO, H.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, M. A. Starch materials as biocompatible supports and procedure for fast separation of macrophages. *Carbohydrate Polymers*.163, p. 108–117, 2017.
- SINGH, V.; SINGH, S.K.; PANDEY, S.; KUMAR, P. **Sol-gel synthesis and characterization of adsorbent and photoluminescent nanocomposites of starch and sílica**. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2011.