



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

ESTUDO DA ATIVIDADE PEROXIDÁSICA DOS BIOCATALISADORES HÍBRIDOS TEOS-AMIDO-PEROXIDASE TOYOBO FRENTE AO ÍNDIGO CARMIM

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 Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, e-mail: ivanmartins@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: peroxidase, suporte híbrido e índigo-carmim

INTRODUÇÃO

O interesse no tratamento enzimático de efluentes vem aumentando, pois se tem observado o aumento da concentração de poluentes orgânicos e persistentes nos efluentes, o que limita a possibilidade da utilização de tratamentos convencionais de maneira eficiente. Por outro lado, as enzimas são catalisadores biológicos que apresentam vantagens potenciais quando utilizadas no tratamento de efluentes. A peroxidase são enzimas do grupo das oxidorredutases, que podem ser produzidas por micro-organismos e plantas, catalisando reações de oxirredução.

A imobilização de enzimas em suportes híbridos mesoporosos (orgânico e inorgânico) atualmente tem um grande potencial, devido a que apresentam melhores características quando comparadas a seus componentes separadamente.

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a peroxidase TOYOBO em suportes híbridos TEOS-AMIDO e aplicar os mesmos na descoloração do índigo carmim.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA:

MATERIAL:

Peroxidase TOYOBO, isoenzima C (HRP - 90,23 U/mg), tetraetilortosilicato (TEOS), ácido clorídrico, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), acetato de sódio, hidróxido de sódio (NaOH), guaiacol, peróxido de hidrogênio 30 %, corante índigo carmim da Riedel, Alemanha. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico de pureza.

MÉTODOS:

Síntese do Suporte Híbrido: A obtenção dos suportes híbridos foi realizada utilizando a metodologia descrita Álvarez et. al. (2017). Quantidades variadas do aditivo orgânico (amido) 0,1g; 0,5g e 1,0g foram dissolvidas em 30mL de água e 1,17mL de HCl (2 M). Em seguida 5,0 mL de TEOS foi adicionado à solução. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após este tempo a reação se aqueceu a 80 °C durante 24 horas. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água destilada até o pH neutro. O material sintetizado foi seco à temperatura ambiente.

Imobilização da peroxidase por Adsorção física (AF):

Na metodologia de imobilização por adsorção física (AF) o suporte seco foi suspenso em solução tampão fosfato e mantido sob agitação mecânica por 15 minutos. Se adicionou solução de HRP (0,1; 0,3 e 05 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0 no carregamento de enzima

desejado, e em seguida se adicionou o tampão até o volume final de 10 mL. O sistema foi mantido sob agitação por 3 horas a 25 °C, em seguida, armazenado a 4 °C em condição estática, durante 24 horas. Finalmente, o biocatalisador imobilizado foi filtrado e lavado com solução tampão para retirada de enzimas não adsorvidas e o filtrado foi reservado para quantificação da atividade enzimática. A determinação da umidade do biocatalisador imobilizado foi realizada por titulometria (Karl Fisher) em equipamento Metrohm.

Caracterização do suporte de imobilização: Os suportes foram caracterizados por técnicas de Infravermelho (FTIR).

Descoloração do Corante Índigo Carmim: Inicialmente foi preparado uma solução (Solução Mãe) do corante índigo carmim (0,1 mol/L) contendo 1,2 mg (10 mmol) do corante, 765 µL de peróxido de hidrogênio a 30% sendo o volume completado com solução tampão de acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 até 100 mL.




Em frascos de 10 mL se pesaram 20 mg do biocatalisador (SA01-1mgHRP) (carregamento 1mg peroxidase/g suporte) e 5mL da solução mãe. A mistura foi agitada (150 rpm) em shaker por 60 min, a temperatura de 40 °C. A absorbância foi analisada para um comprimento de onda de 610 nm. O percentual de descoloração foi calculado através da seguinte equação:

$$\text{Descoloração (\%)} = [(Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}) / Abs_{\text{inicial}}] \times 100$$

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A síntese dos suportes híbridos sílica-amido comercial foi realizada a partir da metodologia descrita Álvarez et. al. (2017) com algumas modificações. Todas as reações químicas foram realizadas em duplicata. Na tabela 1 se apresenta a relação entre a massa de amido comercial utilizado (precursor orgânico), a massa de suporte obtido, assim como as características físicas do suporte.

TABELA 1. Dados da síntese dos suportes obtidos.

SUPORTE	MASSA DO AMIDO COMERCIAL (g)	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA SUPORTE	MASSA DO SUPORTE (g)
SA01	0,1		4,2
SA05	0,5		4,6
SA1	1,0		5,5

Pode se observar na tabela 1, que independentemente da quantidade de amido utilizada, não existe diferença significativa na massa do suporte obtida. O amido comercial e os suportes sintetizados (SA01, SA05 e SA1) foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho acoplado a transformada de Fourier (FT-IR), figura 1.

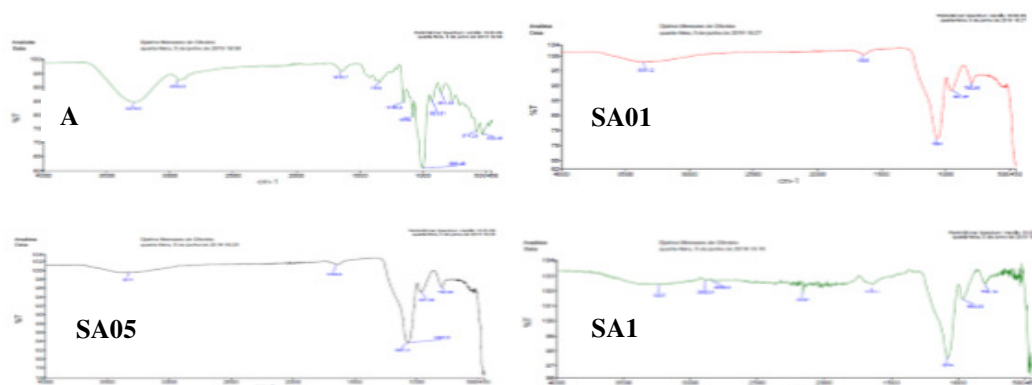


Figura 1. Espectros de infravermelho (FT-IR) do amido comercial (A), do suporte SA01, SA05 E SA1 respectivamente.

No espectro infravermelho do amido comercial, figura 1A, pode-se observar algumas bandas características de carboidratos que nos permitiram interpretar e compreender a possível estrutura dos suportes sintetizados. Um grupo funcional inerente a esta estrutura é o agrupamento hidroxila (OH) o qual aparece no espectro como uma banda larga correspondente ao estiramento O-H ao redor de $3278,5\text{cm}^{-1}$. Outra banda típica de carboidratos de cadeia aberta é banda de vibração de valência C=O que se localiza em $1639,7\text{ cm}^{-1}$, proveniente da carbonila terminal de um polissacarídeo. A banda que se encontra ao redor de 1334 cm^{-1} corresponde à dublagem fora do plano C-O-H e a banda que aparece em $999,46\text{ cm}^{-1}$ correspondente as vibrações C-O que muitas vezes estão acopladas as vibrações C-C adjacentes.

Nos espectros de infravermelho dos suportes SA01, SA05 e SA1 pode-se observar que não existem diferenças significativas nas bandas presentes nos suportes independentemente da quantidade de amido utilizado. Em todas as figuras se observa a banda concernente ao agrupamento Si-OH, que no suporte SA1 se encontra em 1074 cm^{-1} , para o suporte SA05 aparece em $1067,5\text{ cm}^{-1}$ e para o suporte SA01 em 1061 cm^{-1} . Pode se observar também que a banda larga correspondente ao estiramento O-H ao redor de $3278,5\text{cm}^{-1}$ diminui em intensidade o que sugere que a formação do silano (ligação O-Si-O) tenha acontecido entre os agrupamentos hidroxilas das unidades de glicose e TEOS.

Na figura 2 se apresenta as eficiências de imobilização para os suportes SA01, SA05 e SA1 respectivamente, onde podemos observar de forma geral que quanto maior é a quantidade de enzima utilizada maior é a eficiência de imobilização. Os resultados mostram que o melhor suporte é o SA01 porque a diferença de eficiência de imobilização para os três suportes (SA01, SA05 e SA1) foi semelhante sendo que o suporte SA01 foi sintetizado utilizando menor quantidade de amido.

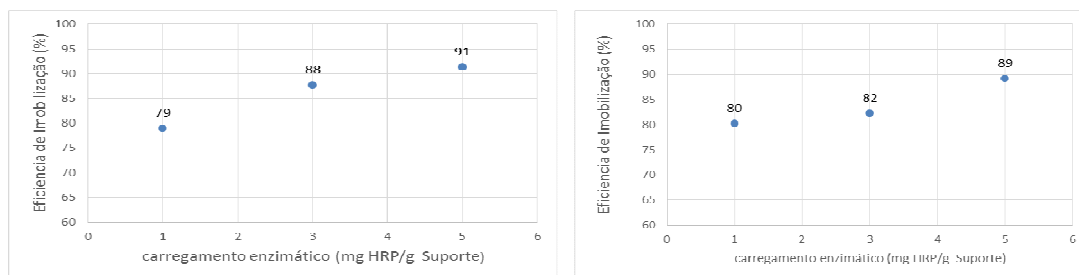


Figura 2. Eficiência de imobilização para o suporte SA01 e SA1.

Os suportes carregados com 1mg de HRP (SA01-HRP; SA05-HRP e SA1-HRP) foram utilizados para descolorir a solução de índigo carmin, figura 3.

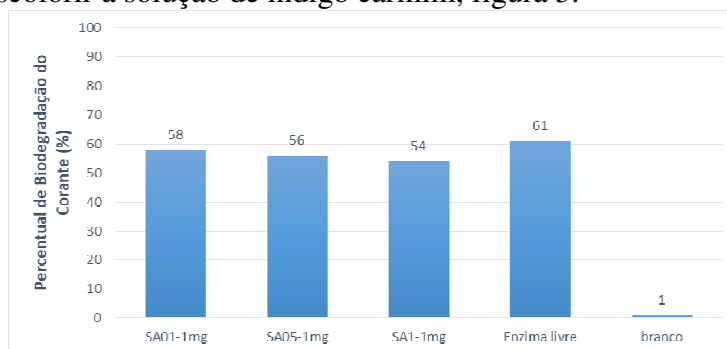


Figura 3. Percentual de descoloração do índigo carmin (0.1M) utilizando os biocatalisadores SA01-1mgHRP, SA05-1mgHRP, SA1-1mgHRP a 40 °C, 60 min.

Na figura 3 pode-se observar uma maior descoloração da solução de índigo ao utilizar a enzima livre devido a que a enzima livre se encontra na mesma da mistura reacional (catálise homogênea).

O melhor biocatalisador resulto ser o SA01 porque teve maior percentual de descoloração comparado aos outros biocatalisadores. Este resultado é promissor porque o biocatalisador (SA01-1mgHRP) tem o menor carregamento de enzima e a menor quantidade de amido. Trabalhos posteriores visaram a utilização de biocatalisadores híbridos com maior carregamento de enzima e maior tempo de reação.

A reação branco refere-se a uma solução de índigo carmin (0,1M) em acetato de sódio 0,1M, pH 5 (solução tampão) na presença de peróxido de hidrogênio. Pode se perceber que na reação “branco” quase não houve degradação com o índigo pelo que seria necessária a presença de um biocatalisador para acelerar o processo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhor suporte de imobilização resultou ser o SA01, aquele que teve menor quantidade de amido.

Diante dos resultados obtidos na descoloração do índigo carmin, chegou à conclusão que todos os biocatalisadores são eficientes. Desta forma se torna notório que não é necessário uma grande quantidade de amido para a produção do suporte híbrido, podendo tratar áreas residuais com a presença de índigo carmin utilizando o biocatalisador SA01-1mgHRP.

REFERÊNCIAS

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. Química Nova, v. 34, p. 831-840, 2011.

BARRETO, I. M. et al. Suportes híbridos de sílicamonossacarídeos: materiais potenciais para imobilização de peroxidase rap – Toyobo. Ciências Exatas e da terra e a dimensão adquirida através da evolução tecnológica 2. Atena editora. 2019, p 247.