

Imobilização da Peroxidase de Raiz Forte nos suportes Amberlite IRA 67 e IRC 748 com Níquel (II) e Sulfato de Cobre (II) pentahidratado (CuSO₄.5H₂O)

Harvel Lima Santos¹; Heiddy Marquez Alvarez²; Maria Antônia Carvalho Lima de Jesus³ e Alini Tinoco Fricks⁴

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

harvellima@gmail.com

2. Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheddy@gmail.com

3. Participante do projeto, Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

airamcarvalho@gmail.com

4. Participante do projeto, pesquisador Biotecnologia do ITP, Universidade Tiradentes, e-mail: alinitf@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização, HRP, Suportes

INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores eficientes para uma série de reações de biotransformação. Essas enzimas catalisam reações de oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos utilizando, em muitas delas, o peróxido de hidrogênio como agente oxidante (SATO *et al.*, 1995). Uma dessas enzimas é a peroxidase de raiz forte (HRP). A HRP apresenta alta estabilidade, baixo custo e resposta em um amplo intervalo de pH. A HRP é muito utilizada na oxidação de compostos fenólicos, por tanto, amplamente aplicada no setor ambiental para monitoramento de contaminantes em efluentes provenientes das indústrias.

As enzimas podem participar das reações de biotransformação na forma livre ou na forma imobilizada. O uso da enzima livre é limitado devido a sua instabilidade e alto custo. O uso da enzima modificada apresenta benefícios como uma melhor estabilidade no meio reacional podendo ser aplicada em diferentes condições de reação podendo ser reutilizada mais vezes reduzindo significativamente o custo da sua utilização (XU *et al.*, 2013).

Um das técnicas de imobilização de enzimas é a imobilização por adsorção. A enzima não adsorvida é removida com tampão. O mecanismo de adsorção é baseado em ligações fracas como forças de Van der Waals e /ou interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

Neste trabalho utilizamos como suportes as resinas amberlites IRA 67 e amberlite IRC 748. A resina amberlite IRA 67 é uma resina aniônica fraca com matriz acrílica do tipo gel apresentando alta especificidade para um íon ou grupos de ions. A resina Amberlit IRC 748 é uma resina quelante de troca iônica, também conhecida como complexante ou resina de íon específico, apresentando alta especificidade para um íon ou grupos de ions (ZAINOL E NICOL, 2009).

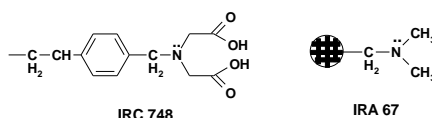


Figura 1. Estrutura química das resina Amberlite IRA 67

Diante da importância da imobilização de enzimas e das características da amberlite como adsorvedor, o presente estudo foi proposto visando imobilizar a HRP em diferentes suportes como Amberlite IRA 67 e amberlite IRC 748 puras e modificadas através da troca iônica com níquel (II) e sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄.5H₂O).

METODOLOGIA

Impregnação de Níquel (II) e Sulfato de Cobre (II) pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) nos suportes Amberlite IRA67 e Amberlite IRC 748

A HRP foi imobilizada por adsorção física (ADS) em resinas de troca iônica (amberlite IRA 748 e amberlite IRA 67). Para a resina IRA 748 foi realizada a impregnação com Ni²⁺ e em

todos os experimentos, utilizando essa resina, foi oferecido 0,008 mg HRP/g de suporte. Num frasco de 50 mL foram adicionados 5,0 g do suporte e 20 mL de uma solução de sulfato de cobre (II) pentahidratado 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.

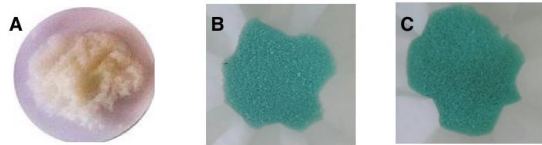


Figura 2: A) Resina amberlite IRA 67. B) Resina amberlite IRA 67 impregnada com solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,03M. C) Resina amberlite IRA 67 impregnada com solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3M.

Imobilização da Peroxidase HRP nos Suportes

Num frasco com tampa foi adicionado 0,5g do suporte, a quantidade da HRP variou de acordo com os carregamentos (0,125-3mg HRP/g suporte) e 5 mL de solução tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,1 M, pH 7,0. Esse procedimento foi realizado com o suporte sem o íon Cu^{2+} (branco) e com o suporte impregnado com a solução de sulfato de cobre (II) pentahidratada nas concentrações de 0,03 e 0,3M. A mistura de reação foi agitada num shaker durante 3 horas a 30°C. Logo após, foram armazenados a 4°C por 24 horas. Após esse período, ocorreu a filtração e a análise da atividade enzimática para cálculo da eficiência de imobilização (E.I.).

Determinação da atividade peroxidásica

A atividade enzimática da HRP foi determinada por método colorimétrico, baseado na mudança de absorbância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol durante três minutos ($\epsilon_{\text{tetraguaiacol}}: 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (HIRATA *et al.*, 1998). 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 7,0. A eficiência de imobilização (%) e o número de unidades de enzima imobilizada (U) foram determinados pela diferença entre número de unidades de peroxidase oferecidas (U_o) e o número de unidades de enzima remanescente no filtrado (U_f), conforme a equação: $\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \frac{(U_o - U_f) \times 100}{U_o}$

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada eficiência como suporte na imobilização da enzima HRP de dois amberlites, a IRA 748 e a IRA 67. De acordo com a Figura 3, observa-se que para pH 7,0 teve um aumento da eficiência de imobilização utilizando o suporte amberlite IRA 478 na medida que aumenta a concentração enzimática. Para pH 8,0 os resultados oscilaram. De uma forma geral, os valores para eficiência de imobilização mostraram-se elevados para os pHs estudados. A eficiência de imobilização foi alta, mas a concentração de enzima usada não foi suficiente para que ocorresse atividade no biocatalisador.

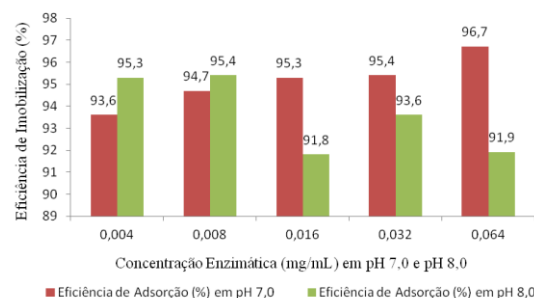


Figura 3: Eficiência de Imobilização para a IRA 748 nos pHs 7,0 e 8,0.

O efeito da impregnação do íon cobre (II) foi estudado na amberlite IRA 67 para concentrações do metal de 0,03M e 0,3M.

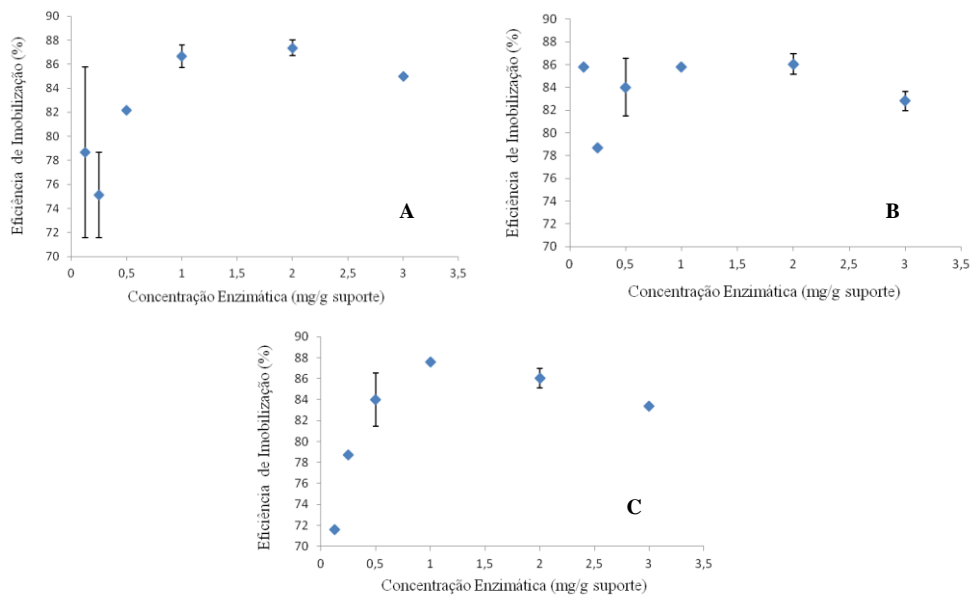
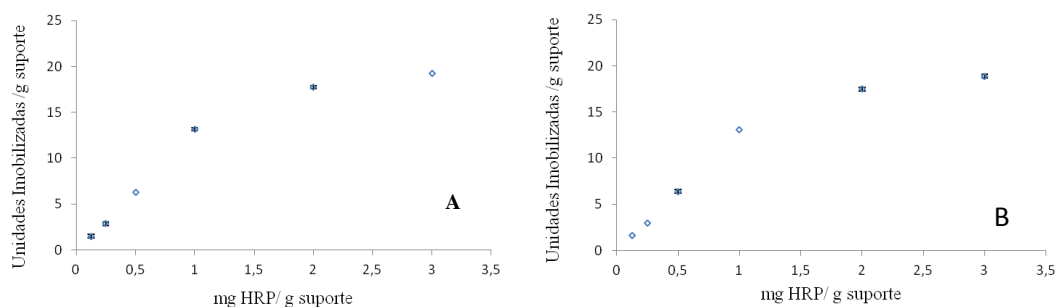


Figura 4: Eficiência de Imobilização da HRP em resina amberlite IRA 67. A) Controle, sem metal. B) Suporte com o íon Cu^{2+} 0,03M. C) Suporte com o íon Cu^{2+} 0,3M.

Na figura 4 se apresentam os resultados obtidos através do método de imobilização por adsorção física (ADS) usando a amberlite IRA 67 sem metal e com impregnação de cobre (II) a diferentes concentrações. Nos gráficos pode-se observar 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 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 atribuído provavelmente à sobrecarga de enzima no suporte que leva à limitações difusionais para o substrato.

Os resultados mostram que o carregamento de 1,0 mg de HRP/g de suporte é considerado ideal para imobilização de HRP por ADS em amberlite IRA 67. As eficiências de imobilização foram: Controle (87,1%); IRA 67-Cu (II) 0,03M (85,8%) e IRA 67-Cu (II) 0,3M (87,5%). Observou-se também que a presença do íon Cu^{2+} no suporte não influenciou de forma significativa na eficiência de imobilização.

Na figura 5 se apresentam os resultados obtidos com o carregamento enzimático.



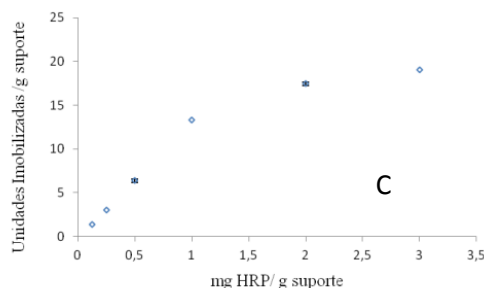


Figura 5: Efeito do carregamento enzimático (0,125 - 3 mg HRP/g suporte) na imobilização da HRP em Amberlite IRA 67. A) Controle. B) impregnada com o íon Cu^{2+} 0,03M. C) impregnada com o íon Cu^{2+} 0,3M.

Apesar da alta eficiência de imobilização, a enzima imobilizada no suporte IRA 67 nos carregamentos enzimáticos (0,125 mg HRP/g; 0,25 mg HRP/g; 0,5 mg HRP/g e 1 mg HRP/g suporte) não apresentou atividade. Para os carregamentos 2 e 3 mg HRP/g suporte, a enzima imobilizada apresentou atividade enzimática nos suportes impregnados com o metal cobre.

Tabela 1: Atividade do biocatalisador Amberlite IRA 67 nos carregamentos 2 e 3 mg HRP/g suporte.

| Concentração íon Cu^{2+} | Atividade Imobilizado (U/mL) | |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| | 2 mg HRP/g suporte | 3 mg HRP/g suporte |
| 0,03M | $1,1 \times 10^{-4}$ | $1,1 \times 10^{-4}$ |
| 0,3M | $1,5 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ |

De acordo com a Tabela 1, a atividade no imobilizado foi maior ao usar uma concentração maior do íon Cu^{2+} .

CONCLUSÕES

A eficiência de adsorção da enzima HRP nas resinas amberlite IRA 748 e IRA 67 mostrou-se satisfatória. Os valores de eficiência para amberlite IRC 748 mostraram-se elevados o que indica que toda a enzima interagiu com o suporte ficando uma atividade residual no filtrado muito baixa refletindo em altos valores para a eficiência. Os valores de eficiência para amberlite IRA 67 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 nessa resina. O metal cobre não influenciou na eficiência de imobilização, mas na atividade dos imobilizados, da amberlite IRA 67, de maior carregamento (2 e 3 mg HRP/g suporte).

REFERÊNCIAS

- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. **Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotiana tabacum***. Tetrahedron, v. 54, p. 15993-16003, 1998.
- SATO, k.; HASUMI, H.; TSUKIDATE, A.; SAKURADA, J.; NAKAMURA, S.; HOSOYA, T. **Effects of mixed solvents on three elementary steps in the reactions of horseradish peroxidase and lactoperoxidase**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1253, p. 94-102, 1995.
- XU, R.; CHI, C.; LI, F.;ZHANG, B. **Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrinous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A**. Bioresource Technology, v. 149, p. 111-116, 2013.
- ZAINOL, Z.; NICOL, M.J. **Ion-exchange equilibria of Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} with iminodiacetic acid chelating resin Amberlite IRC 748**. Hydrometallurgy, v. 99, p. 175-180, 2009.