

# IMOBILIZAÇÃO DA HRP POR ENCAPSULAMENTO E ADSORÇÃO EM ESFERAS DE ALGINATO COM CLORETO DE CÁLCIO E CLORETO DE COBALTO (II)

**Maíra Almeida<sup>1</sup>; Heiddy Álvarez <sup>2</sup>; Maria Antônia de Jesus<sup>3</sup>**

1. Maíra Luane Sampaio de Almeida PROBIC/UEFS, Graduando em licenciatura em Química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [luane.maira@gmail.com](mailto:luane.maira@gmail.com)
2. Heiddy Márquez Álvarez, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [marquezheddy@gmail.com](mailto:marquezheddy@gmail.com)
3. Maria Antônia Carvalho Lima de Jesus, Departamento de Exatas Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [airamcarvalho@gmail.com](mailto:airamcarvalho@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** Imobilização, Alginato, Enzima, Peroxidase, Biocatalisador

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os polímeros biológicos estão sendo muito utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos. Em particular, a utilização de alginato de sódio, polímero natural extraído de algas marrons, tem adquirido grande importância. O alginato de sódio é um polímero biocompatível e biodegradável, fácil de ser funcionalizado e de baixo custo (YANG et al., 2011). Devido as suas propriedades físico-químicas, os alginatos tem sido muito utilizado em processos de imobilização (DONATI et al., 2005; STEWART et al., 2014). Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Neste processo, as enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (VILLENEUVE et al., 2009). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é imobilizar HRP em esferas de alginato pelo método da Adsorção Física e Encapsulamento utilizando íons cálcio e íons cobalto (II) para formação das esferas avaliando a eficiência de imobilização.

## MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Foram utilizados peroxidase de raiz forte, isoenzima C (HRP -  $98,15 \pm 7,38$  U/mg), alginato de sódio 5%, cloreto de cálcio e cloreto de cobalto (II) 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), guaiacol e peróxido de hidrogênio 30 % (solução aquosa) da Vetec Química, RJ, Brasil. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza. As esferas de alginato foram sintetizadas utilizando a metodologia de SANTOS et al. (2014). Uma solução de alginato de sódio 5 % foi gotejada sobre soluções de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e cloreto de cobalto (II)  $\text{CoCl}_2$  sob agitação constante, nas seguintes proporções:

- Condição reacional A: 10mL  $\text{CoCl}_2$  (0,3M) + 10 mL  $\text{CaCl}_2$  (0,3M),
- Condição reacional B: 10mL  $\text{CoCl}_2$  (0,3M) + 20 mL  $\text{CaCl}_2$  (0,3M),
- Condição reacional C: 10mL  $\text{CoCl}_2$  (0,3M) + 30 mL  $\text{CaCl}_2$  (0,3M),
- Condição reacional D: 10mL  $\text{CoCl}_2$  (0,3M) + 10 mL  $\text{CaCl}_2$  (0,6M),
- Condição reacional E: 10mL  $\text{CoCl}_2$  (0,3M) + 10 mL  $\text{CaCl}_2$  (0,9M).

A peroxidase de raiz forte (HRP) foi imobilizada por Adsorção Física e Encapsulamento utilizando íons Ca e Co(II) em esferas de alginato. Para a imobilização por adsorção física foram utilizados frascos de vidro com tampa de 12 mL de capacidade.

### RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

As esferas usadas para a imobilização por adsorção e encapsulamento foram formadas com o cloreto de cálcio e também com a mistura do cloreto de cálcio e cloreto de cobalto. O percentual de cobalto impregnado nas esferas de acordo com as condições reacionais encontra-se na Tabela 1. Na Figura 2 estão as esferas de alginato com o cloreto de cálcio (A) e com a mistura do cloreto de cálcio mais o cloreto de cobalto (II) (B) respectivamente.



**Figura 1:** A) Esferas de Alginato com Cloreto de Cálcio. B) Esferas de Alginato com Cloreto de Cálcio e Cloreto de Cobalto (II).

**Tabela 1:** Percentual de Cobalto (II) impregnado nas esferas de alginato.

Condições Reacionais	(%) Cobalto (II) impregnado nas esferas
A: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	88
B: (1:2) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	91
C: (1:3) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	94
D: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,6M)	70
F: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,9M)	70

#### 1. IMOBILIZAÇÃO DA HRP POR ADSORÇÃO FÍSICA

O alginato é um polissacarídeo muito utilizado como suporte orgânico na imobilização de enzimas devido à quantidade de grupos hidroxilas e carboxilato presente na estrutura o que facilita a formação de gel e a adsorção ou encapsulamento de diversas enzimas. Foi verificado na literatura especializada que as esferas de alginato são fácil de sintetizar, de baixo custo e apresentam alta biocompatibilidade, mas a resistência mecânica é baixa (SANTOS, 2014).

Neste trabalho a HRP comercial foi imobilizada por Adsorção Física e Encapsulamento sob a influência dos íons cálcio e íons cobalto (II). Em todos os experimentos foi oferecido 0,008 mg HRP/g de suporte.

**Tabela 2:** Eficiência de adsorção da enzima HRP nas esferas de alginato de cálcio e alginato de cobalto (II).

Condição reacional na formação das esferas de alginato	Eficiência de Imobilização (%)
A: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	98,7
B: (1:2) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	98,6
C: (1:3) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	98,6
D: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,6M)	98,6
F: (1:1) CoCl <sub>2</sub> (0,3M):CaCl <sub>2</sub> (0,9M)	98,6

## 2. IMOBILIZAÇÃO DA HRP POR ENCAPSULAMENTO

Para o encapsulamento, a concentração de alginato foi fixada em 5%. Segundo Santos (2014) o maior valor de recuperação da atividade na imobilização por encapsulamento foi de 5,11 % com esferas obtidas a partir de uma solução contendo 5% de alginato de sódio. Quiroga et al. (2011) realizou em seu trabalho o estudo do efeito da concentração de alginato na faixa de 0,5 - 4% e concluiu que baixas concentrações de alginato de sódio levam à formação de esferas menos reticuladas.

Para o encapsulamento em que a enzima foi misturada com o alginato e então gotejada sobre as soluções de cloreto de cálcio e cloreto de cobalto (II) o valor da eficiência de imobilização foi de 87,2%.

**Tabela 3:** Eficiência de Imobilização variando-se o carregamento de HRP na imobilização em esferas de alginato de sódio e cloreto de cálcio e esferas de alginato de sódio mais a mistura de cloreto de cálcio e cloreto de cobalto.

Concentração da HRP (mg/mL)	E.I (%) CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	E.I (%) CaCl <sub>2</sub> : CoCl <sub>2</sub> (0,3M) (1:1)
0,1	72,0	48,3
1,0	45,5	30,0

Com relação ao carregamento enzimático, observa-se que um carregamento maior de enzima (1mg/mL) promove uma diminuição na eficiência de imobilização. Este resultado pode ser atribuído provavelmente à sobrecarga de enzima no suporte.

**Tabela 4:** Unidades Oferecidas no suporte

Concentração da HRP (mg/mL)	U/g CaCl <sub>2</sub> (0,3M)	U/g CaCl <sub>2</sub> : CoCl <sub>2</sub> (0,3M) (1:1)
0,1	16,3	15,6
1,0	13,4	15,3

Com relação as unidades oferecidas no suporte, observa-se que há uma diminuição no número de unidades à medida que a concentração enzimática aumenta. Essa diferença foi mais pronunciada para o suporte contendo somente o cloreto de cálcio.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação a imobilização por adsorção, o valor para as eficiências de imobilização deram alto provavelmente porque a enzima se ligou ao suporte ficando uma atividade residual no

filtrado muito baixa refletindo assim em altos valores para a eficiência. Com relação ao encapsulamento observou-se que a maior eficiência de imobilização ocorreu com uma menor concentração de enzima (0,1mg/mL) e para o suporte que tinha apenas o cloreto de cálcio.

## REFERÊNCIAS

- ALEMZADEH, I.; NEJATI, S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 1082–1086, 2009.
- AWADA, G.E.A.; AMER, H.; EL-GAMMAL, E. W.; HELMY, W.A.; ESAWY, M. A.; ELNASHAR, M. M. M. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 740–746, 2013.
- BASHARI, M.; ABBAS, S.; XU, X.; JIN, Z. Combined of ultrasound irradiation with high hydrostatic pressure (US/HHP) as a new method to improve immobilization of dextranase onto alginate gel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1325–1334, 2014.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímero. **Química Nova**, 27, p. 623-630, 2004.
- DONATI, I.; HOLTAN, S.; MORCH, Y. A.; BORGONA, M.; DENTINI, M.; SKJAK-BRAEK, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1031–1040, 2005.
- GANAIE, M. A.; RAWA, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 840–844, 2014.
- HASCHKE, R. H.; FRIEDHOFF, J. M. Calcium-related properties of Horseradish Peroxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 80, p. 1039 - 1042, 1978.
- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotiana tabacum*. **Tetrahedron**, 54, p. 15993 -16003, 1998.
- MANU, B. T.; RAO, U. J. S. P. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 114, p. 66 - 71, 2009.
- MILOVANOVIC', A.; BOZ'IC', N.; VUJC'IC', Z.. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. **Food Chemistry**, v. 104, p. 81–86, 2007
- NAWAZ, M. A.; REHMAN, H.U.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 4, p. 250–256, 2015.
- NGUYEN, L. T.; LAU, Y. S.; YANG, K-L. Entrapment of cross-linked cellulase colloids in alginate beads for hydrolysis of cellulose. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 862–869, 2016.
- QUIROGA, E.; ILLANES, C. O.; OCHOA, N. ARIEL.; BARBERIS, S. Performance improvement of araujiain, a cysteinphytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1029–1034, 2011.
- REHMAN, H. U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A.U.; MOLINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis*