

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL BIOQUÍMICA DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE IMOBILIZADA EM MICROESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO POR DIFERENTES METODOLOGIAS NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO

F. M. S. SANTOS¹, R. M. C. DOS SANTOS¹, D. S. M. SILVEIRA¹, M. N. MELO¹, Á. S. LIMA¹, H. M. ALVAREZ², C. M. F. SOARES¹, A. T. FRICKS¹

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa

² Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Exatas
Email para contato: flaviabiotec@gmail.com

RESUMO - O presente estudo objetivou caracterizar bioquimicamente a peroxidase de raiz forte (PRF) imobilizada por adsorção física (ADS) e encapsulamento (EN) em microesferas de alginato de cálcio na presença de líquido iônico (LI) imidazólico. A PRF imobilizada foi avaliada quanto ao pH (4,0-9,0) e temperatura (25-60°C) ótimos, parâmetros cinéticos (V_m e K_m) e estabilidade operacional. PRF imobilizada por ADS e EN apresentaram atividade relativa maior em pH 8,0 e a 25°C. PRF imobilizada na presença de LI apresentou atividade superior a PRF imobilizada na ausência de LI. A imobilização de PRF por ADS e EN possibilitou a atuação da enzima também a 40 °C. PRF imobilizada mostrou diminuição nos valores de K_m em comparação com a PRF livre, sugerindo aumento da afinidade da enzima com o substrato. PRF imobilizada por ADS apresentou 7 ciclos de reutilização com atividade superior a 50 % da inicial. A utilização de LI promoveu a obtenção de PRF imobilizada com características bioquímicas diferenciadas.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são consideradas “catalisadores ecologicamente corretos” por suas características operacionais convergirem às exigências legais para que as indústrias operem seus processos em condições de desenvolvimento sustentável, ou seja, por meio da chamada “química verde” ou sistemas de tecnologia limpa. Tais características abrangem um vasto leque de aplicações para as enzimas em diversos setores industriais, tais como: alimentos, cosméticos e químico-farmacêutica.

No que se refere aos processos oxidativos, as peroxidases são as enzimas mais utilizadas, tanto do ponto de vista ambiental, para controle e monitoramento de poluentes e do ponto de vista sintético com a transferência seletiva de oxigênio, oferecendo assim rota de síntese alternativa para bioaromas e epóxidos derivados de propenilbenzenos, por exemplo. A HRP é também aplicada na identificação de compostos antioxidantes em alimentos e bebidas, formulação de kits de diagnósticos e na remoção de peróxido de materiais, tais como alimentos e resíduos industriais. Dentre as peroxidases vegetais, a peroxidase de raiz forte (PRF) tem se destacado, no entanto sua aplicabilidade industrial quando na forma livre é inviabilizada devido à impossibilidade de reuso da mesma, o que oneraria muito o processo.

A imobilização de enzimas viabiliza a recuperação do biocatalisador imobilizado (BI) e o principal intuito na imobilização é obter um catalisador que mantenha a eficiência catalítica e estabilidade operacional durante o processo de síntese, em comparação com sua forma livre. Normalmente a imobilização de enzimas possibilita uma ampliação nas condições operacionais (aumento da faixa de atuação da temperatura, pH, termoestabilidade e ainda maior tolerância a solventes orgânicos) e o desenvolvimento de processos que operem continuamente. É importante ressaltar que PRF imobilizada é, frequentemente, mais estável nas condições experimentais que envolvam temperaturas mais elevadas ou em pHs diferenciados.

Para a enzima imobilizada obter atividade elevada se faz necessário a utilização de suportes sólidos biocompatíveis. Dentre os suportes relatados na literatura merece destaque o uso de polímeros naturais, como o alginato, por apresentarem uma série de vantagens como: boa biocompatibilidade, baixo custo, facilidade de acesso, resistência a contaminação microbiana e simplicidade na preparação.

Com intuito de melhorar a eficiência catalítica e estabilidade de diferentes BI, uma das estratégias utilizadas na literatura é o uso de aditivos. Entre os aditivos utilizados no processo de imobilização, merece destaque o uso dos líquidos iônicos (LIs) (SOUZA *et al.*, 2013), os quais são sais orgânicos primariamente utilizados em substituição aos solventes orgânicos tradicionais. Como aditivos no processo de imobilização de enzimas, o uso de líquidos iônicos pode promover um aumento na atividade e estabilidade das enzimas e alterar a estrutura física do suporte utilizado no processo de imobilização. Embora a literatura apresente alguns relatos sobre o uso de LI no processo de imobilização (MUGINOVA *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2011), ainda se fazem necessários estudos no que diz respeito ao uso de líquidos iônicos apróticos como aditivos na imobilização de peroxidase de raiz forte.

Na literatura existem poucos estudos relacionados ao efeito do líquido iônico na atividade e imobilização de PRF. Diante do contexto apresentado, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar bioquimicamente a PRF imobilizada em microesferas de alginato por adsorção física e encapsulamento na presença dos LIs [C₄mim]Tf₂N e [C₄mim]BF₄, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade enzimática foi determinada por método colorimétrico, baseada na mudança de absorvância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol durante três minutos. O ensaio contém tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0); 0,04 mL do preparado enzimático (solução estoque de PRF: 0,32 mg/mL) diluído 200 vezes; 0,1 mL de solução de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de H₂O₂ 2,0 mM, a 25°C. O volume total de reação: 3 mL. Para dosagem de atividade das amostras imobilizadas, cerca de 8 mg foram utilizados e foi feita a leitura pontual da absorvância em 470 nm após 3 minutos de reação.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de fornecer 1 µmol de produto em 1 min a 25°C, no pH específico para esta reação. $\epsilon_{\text{tetraguaiacol}}$: 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (HIRATA *et al.*, 1998).

A peroxidase de raiz forte foi imobilizada por encapsulamento e adsorção física em esferas de alginato de cálcio. As esferas de alginato de cálcio foram obtidas por gotejamento de solução aquosa de alginato de sódio 5% em cloreto de cálcio 1M. Utilizando o carregamento mais

adequado (0,16 mg de PRF/g de suporte) foram conduzidas as imobilizações de PRF por adsorção física na presença de LI [C₄mim]TF₂N e encapsulamento na presença de LI [C₄mim]BF₄, sendo esses LIs os que apresentaram resultados significativos em trabalhos prévios realizados pelo grupo. O LI foi adicionado durante a produção do suporte na proporção de 1% (m/v) com respeito ao volume total da reação de imobilização. A escolha da concentração de 1% (m/v) de LIs foi baseada em estudos prévios publicados pelo grupo de pesquisa (SOUZA *et al.*, 2013).

A recuperação de atividade (RA) foi determinada pelo número de unidades de atividade enzimática total presente no suporte (U_s) comparado às unidades de atividade peroxidásica oferecidas para imobilização (U_0), conforme Equação 1:

$$RA (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

Caracterização Bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada para enzima livre e BI por encapsulamento e adsorção física na ausência e presença do LI que propiciou maior atividade. Para determinação do pH ótimo foram realizados ensaios de atividade conforme o item 4.2 a 25°C na faixa de pH de 4,0 a 9,0. Para determinação da temperatura ótima ensaios de atividade foram realizados nas temperaturas de 25, 30, 40, 50 e 60°C. Os resultados foram expressos sob a forma de atividade relativa, utilizando como referencial de 100% o maior valor de atividade obtida. Os parâmetros cinéticos (V_{\max} e K_m) da PRF livre e imobilizada foram determinados quantificando-se suas atividades em U/mg de sólido em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 a 25°C. As concentrações de guaiacol utilizadas foram 100, 80, 60, 40 e 20 mM. Foram obtidos gráficos de duplo recíproco pelo método de Lineweaver-Burk (Equação 1).

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

A estabilidade operacional dos BI foi determinada por oxidação do guaiacol, em regime de bateladas. Foram utilizados 8,0 mg de BI. Após cada ciclo, o imobilizado foi separado do meio reacional e lavado com tampão fosfato (0,1 M pH 6,0) para remoção dos reagentes e produtos que eventualmente ficaram retidos no suporte. Em seguida a peroxidase imobilizada foi reutilizada em novo ciclo nas mesmas condições. Para todos os biocatalisadores imobilizados foram processados o número de ciclos até que a atividade fosse reduzida em pelo menos 50 % da inicial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITO DO PH E TEMPERATURA EM PRF LIVRE E IMOBILIZADA

O efeito do pH na atividade da enzima imobilizada é mostrado na Figura 1. Os experimentos referentes à enzima livre foram realizados e comparados com o descrito por Jiang *et al.* (2014), cuja a atividade máxima atingida em ambos foi no pH 6,0.

De maneira geral o pH ótimo da PRF imobilizada foi 8,0, nota-se que, para as metodologias testadas, na faixa de pH entre 6,0 e 8,0 a AR manteve-se superior a 80%. A atividade da enzima imobilizada diminui em condições ácidas (pH 4,0 e 5,0) e alcalina (pH 9,0). O deslocamento do pH para meio alcalino da enzima livre para a enzima imobilizada, supostamente deve-se a natureza aniônica do suporte de alginato e também devido a uma alteração no micro ambiente da enzima imobilizada (MITTAL *et al.*, 2005).

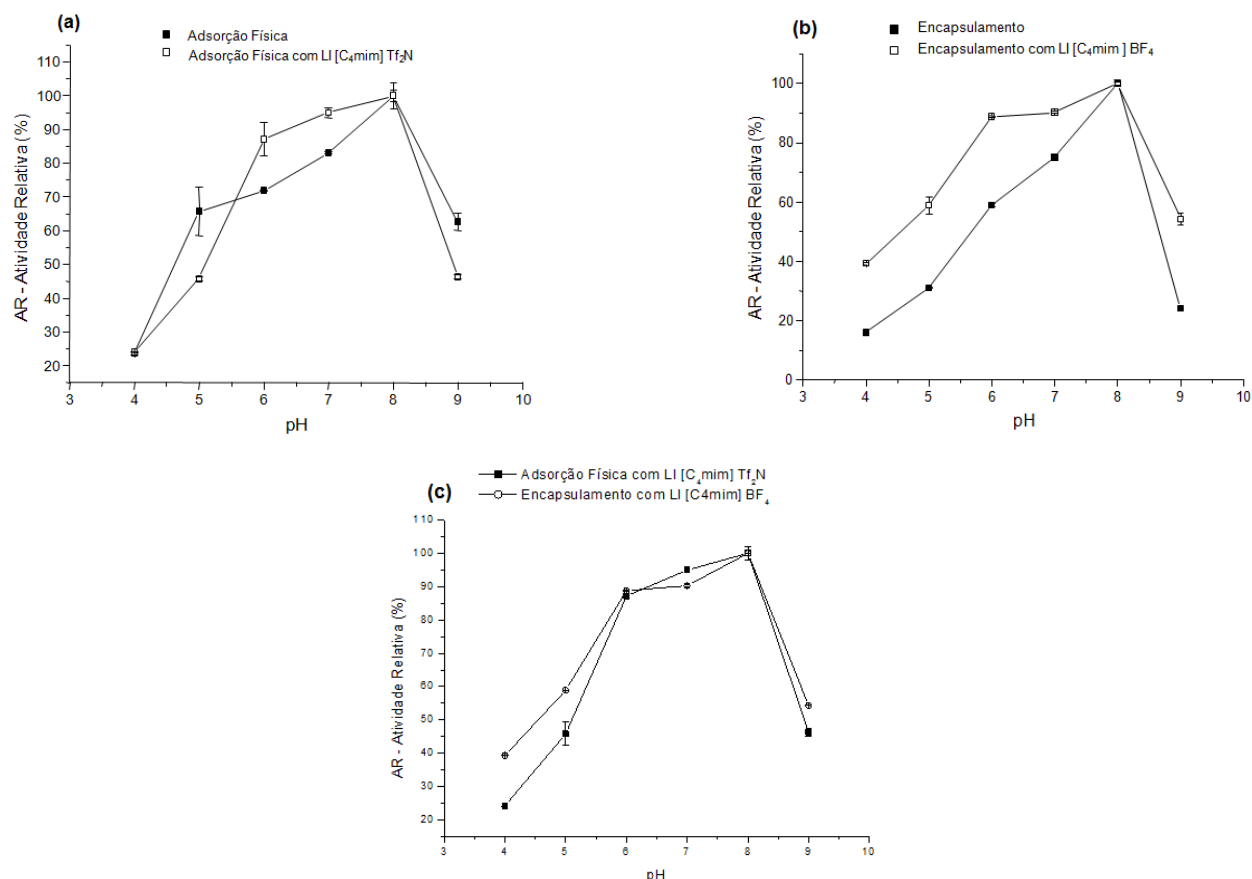


Figura 1 - Efeito do pH na atividade da peroxidase de raiz forte imobilizada na presença e ausência de I (a) por adsorção física; (b) por encapsulamento, (c) melhor condição para cada método.

Na Figura 1.a. apresenta a AR (atividade relativa) da enzima imobilizada por adsorção física na ausência e presença do LI $[C_4mim]Tf_2N$, foi possível observar que AR é superior a 87% entre pH 6,0-8,0 para o método de imobilização testado na presença de LI. Esse fato pode ser justificado pela hidrofobicidade do LI que pode determinar um aumento de moléculas de água em torno da proteína, favorecendo a ação da enzima por aumento da concentração de moléculas de água livre. (SINGH et al., 2010).

Segundo a literatura, LI contendo ânions como Tf_2N , e BF_4 não possuem grande capacidade de formar ligações de hidrogênio, não interagindo fortemente com a enzima e consequentemente, preservando a sua estrutura conformacional (MARIE *et al.*, 2010). Já para a adsorção física na ausência de LI os valores de AR são de 70 % entre pH 6,0-8,0, sugerindo a observação da influência do LI no sistema imobilizado de forma positiva quando comparado com o sistema sem LI.

A imobilização por encapsulamento da PRF em alginato com LI foi superior a AR na ausência de LI Figura 1.b.A Figura 1.c. ilustra os perfis de pH nas melhores condições para adsorção física e encapsulamento. Observa-se que a adsorção física e encapsulamento quando imobilizados na presença de LI apresentaram AR superior a 80 % na faixa de pH 6,0-8,0. Assim pode-se sugerir que a interação eletrostática entre enzima e suporte no micro e macro ambiente foi o que influenciou a estabilidade desses sistemas estudados em pH alcalino.

Foi verificado que a temperatura ótima foi 25°C para a PRF livre e imobilizada nas diferentes metodologias. Quando imobilizada por adsorção física na presença do LI a PRF apresentou atividade relativa superior a 90% entre 25°C e 40°C, já na ausência do LI a enzima teve AR de 53%, na mesma faixa de temperatura, resultado similar foi observado na imobilização por encapsulamento. De maneira geral a imobilização permitiu a atuação da PRF em uma faixa mais ampla de temperatura (25°C e 40°C). No entanto, temperaturas elevadas dentro da faixa experimental estudada (50 e 60°C) ocasionam diminuição brusca na atividade da enzima. Esses dados estão de acordo com a literatura que mostram a queda acentuada da atividade com o aumento da temperatura, indicando que a peroxidase mesmo imobilizada é sensível a altas temperaturas (HU *et al.*, 2012 & JAMAL *et al.*, 2012).

3.2. PARÂMETROS CINÉTICOS

O efeito da concentração do substrato para a enzima livre e imobilizada foram estudados utilizando guaiacol como substrato, a reação foi conduzida em pH 8,0 a 25°C. Os valores de K_m (mM) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$) para a enzima livre e imobilizada pelos métodos de adsorção física e encapsulamento na ausência e presença de LI estão descritos na Tabela 1.

O valor de K_m (mM) é a medida de dissociação do complexo enzima-substrato de forma que quanto menor for este valor maior é a taxa de dissociação do complexo (LIA et al., 1996). $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) indica a taxa máxima de reação, quando a enzima é totalmente saturada com o substrato (SOYSAL & SOYLEMEZ 2005). Os valores obtidos para enzima livre e imobilizada forneceram importantes informações sobre a interação da enzima e o substrato. Os dados obtidos para a PRF imobilizada em esferas de alginato pelas diferentes metodologias realizadas neste trabalho mostram a diminuição nos valores de K_m (mM) em comparação com a PRF livre (Tabela 1). Guncheva & Zhiryakova (2011) relatam que a diminuição do K_m (mM) para a enzima imobilizada indica um substancial acréscimo da afinidade do sítio ativo ao substrato.

A Tabela 1 mostra que o maior valor de V_{\max} foi para enzima livre. Para a imobilização em esferas de alginato pelo método de adsorção física e encapsulamento na presença e ausência de LI foi observado que os valores de V_{\max} ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) seguem o mesmo perfil da recuperação de atividade, onde a adsorção física apresentou RA de 9,35 % na ausência de LI e 50 % na presença de LI, e o encapsulamento mostrou RA de 5,19 e 23,48% na ausência e presença de LI, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos (V_{\max} e K_m) da enzima livre e imobilizada.

Condição	Equação	K_m (mM)	V_{\max} ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Enzima Livre	$y = 5,71 \cdot 10^{-4}x + 2,84 \cdot 10^{-6}$ $R^2 = 0,998$	201,04	352112,67
Adsorção Física	$y = 3076x + 1830$ $R^2 = 0,968$	133,26	0,000456
Adsorção Física com LI	$y = 1289x + 233,7$ $R^2 = 0,982$	5,51	0,00427
Encapsulamento	$y = 24505x + 7216$ $R^2 = 0,982$	3,39	0,000138
Encapsulamento com LI	$y = 3118x + 426,4$ $R^2 = 0,996$	7,31	0,00234

3.3. ESTABILIDADE OPERACIONAL

A estabilidade operacional da enzima imobilizada é realizada para avaliar a capacidade de reutilização dos biocatalisadores selecionados. A enzima imobilizada foi processada, conforme descrito na metodologia até que a atividade atingisse em 50% da atividade inicial. A capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas é imprescindível para a sua aplicação, especialmente em escala industrial. A reutilização da enzima foi realizada para determinar a estabilidade da PRF imobilizada em meio aquoso e orgânico (Figura 2).

Os sistemas imobilizados por encapsulamento na ausência e presença de LI apresentaram baixa estabilidade operacional, com perda da sua atividade superior a 50 % com apenas três ciclos de utilização (Figura 2.a).

No encapsulamento de peroxidase com Concovalina A em suporte híbrido de alginato e amido o biocatalisador imobilizado manteve 75 % de sua atividade inicial após o sétimo ciclo (MATTO e HUNSAIN 2009). Outro estudo mostra que a PRF encapsulada em alginato de cálcio perdeu 50 % atividade inicial após cinco ciclos (ALEMAZED e NEJAT, 2009). Os resultados obtidos no presente trabalho divergem da literatura, a atividade residual foi inferior a 50 % após o segundo ciclo, possivelmente devido à diferença na fonte da enzima ou no sistema enzima-substrato.

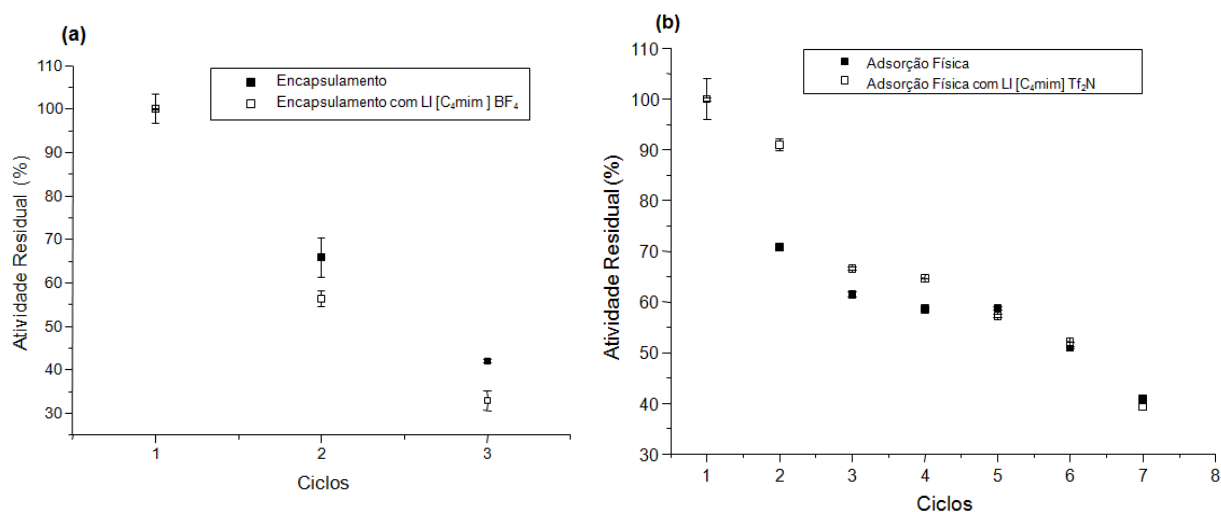


Figura 2 - Teste de estabilidade operacional da PRF imobilizada por encapsulamento e adsorção física ausência e presença de LI.

No estudo da estabilidade operacional dos BI por adsorção física na ausência e presença de LI pôde-se observar uma redução da atividade nos dois sistemas imobilizados, totalizando 6 reutilizações com valores de atividade superiores a 50 % da inicial (Figura 2.b).

Apesar do número de ciclos serem iguais é possível observar uma maior atividade para os biocatalisadores com líquido iônico sugerindo uma maior estabilidade. A perda da atividade durante o processo de reutilização do BI pelo método de adsorção física pode ser explicada pelas fracas ligações ou interações eletrostáticas entre o suporte e a enzima que acarretaram na dessorção durante a lavagem ou outras etapas do processo (KHARRAT et. al., 2011).

4. CONCLUSÕES

A caracterização bioquímica da PRF imobilizada pelos métodos de adsorção física e encapsulamento na presença e ausência de LIs mostrou maior atividade quando o BI foi submetido a pH 8,0 a 25 °C, com AR superior para as imobilizações na presença de LIs. A temperatura ótima da enzima imobilizada para as metodologias realizadas nesse trabalho foi 25 °C, porém a imobilização permitiu que a PRF atuasse em uma faixa mais ampla de temperatura (25 e 40 °C). Os valores de Km e Vmáx da PRF livre foram 171,01 mM e 0,03776 $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. A PRF imobilizada em esferas de alginato pelas diferentes metodologias realizadas neste trabalho exibiu diminuição nos valores de Km (mM) em comparação com a PRF livre. Os BI por adsorção física na presença e ausência de LI apresentaram estabilidade operacional após 7 reutilizações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALEMZADEH, I.; NEJATI, S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *Journal of Hazardous Materials*, 166, p. 1082–1086, 2009.

GUNCHEVA, M. E.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus lipases*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, p. 1-21, 2011.

HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotianatabacum*, *Tetrahedron*, 54, p. 15993-16003, 1998.

JIANG, Y.; TANG, W.; GAO, J.; ZHOU, L.; YING, H. E, Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal, *Enzyme and Microbial Technology*, 55, p. 1-6, 2014.

LIA, J.; TANA, S.N.; GEB, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*, 335, p. 137-145, 1996.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-TALEL; CHAABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopusoryzae* Lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with free enzyme, *Process Biochemistry*, 46, p. 1083 - 1089, 2011.

MARIE-B, L.; GUO, Z.; XU, X. Effect of room temperature ionic liquid structure on the enzymatic acylation of flavonoids, *Process Biochemistry*, 45, p. 1375–1382, 2010.

MATTO, M; HUSAIN, Q. Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, p. 164–170, 2009.

MITTAL, A.; KHURANA, S.; SINGH, H.; KAMBOJ, R. C. Characterization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, p. 318–323, 2005.

SINGH, N. R.; NARINESINGH, D., SINGH, G. Immobilization of β -galactosidase onto Sepharose and stabilization in room temperature ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*, 152, p. 19–27, 2010.

SOUZA, R. L., FARIA, E. L. P., FIGUEIREDO, R. T., FREITAS, L. S., IGLESIAS, M., MATTEDI, S., ZANIN, G.M., SANTOS, O. A. A., COUTINHO, J. A. P., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using sol-gel, *Enzyme and Microbial Technology*, 52, p. 141-150, 2013.

SOYSAL, C.; SOYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment, *Journal of Food Engineering*, 68, p. 349–356, 2005.