

PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA PEROXIDASE EXTRAÍDA DO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) VISANDO APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE AGROTÓXICOS.

F. C. MIHOS¹, N. C. SÁ¹, L. M. C. SILVA¹, A. M. SALGADO¹ e P. R. PEREIRA²

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química – EQ/UFRJ

²Laboratório de análises avançadas em bioquímica e biologia molecular – IQ/UFRJ

E-mail para contato: andrea@eq.ufrj.br

RESUMO – Neste trabalho é proposto um biossensor amperométrico a partir da extração da enzima peroxidase presente no tecido do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), visando à detecção de agrotóxicos. A extração da peroxidase foi avaliada quanto sua atividade presente na casca e na polpa do feijão. O extrato bruto foi parcialmente purificado e caracterizado por eletroforese, apresentando peso molecular de ~ 41,68 kDa. Em pH 6,0 a enzima apresentou maior atividade enzimática; também foi avaliado o percentual de protetor enzimático pela adição de polivinilpirrolidona, apresentado melhor resultado ao se utilizar 10% do protetor em relação a massa do feijão. A purificação parcial se deu com 40% de saturação com sulfato de amônio. O desempenho do biossensor será baseado na transferência de elétrons detectada por voltametria cíclica. Testes iniciais foram realizados solução de $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$, 6,0 mM. O sistema é composto por um eletrodo de trabalho, que consiste em um bastão de grafite, eletrodo de referência $Ag|AgCl(KCl_{sat})$ e eletrodo contra-eletrodo de platina.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental e alimentar pelo uso indiscriminado de produtos agrícolas vem chamando a atenção pelo crescimento ascendente nos últimos anos, sendo que o Brasil é apontado como o maior consumidor de agrotóxicos a nível mundial. Dados atuais da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), mostram que os herbicidas, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados, seguidos de fungicidas 14%, inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% (Anvisa, 2014). Esses compostos podem causar grandes impactos ambientais devido a sua alta toxicidade e persistência com que apresentam no solo, água, plantas e animais (Oliveira, 2008; Richardson & Gangolli, 1994).

Dentre os herbicidas, a atrazina e simazina, classificadas com indicação toxicológica classe III e toxicidade mediana, são utilizadas em uma variedade de culturas (Weber, 1994). A simazina é aplicada em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, pinus, seringueira, sisal, sorgo e uva (García *et al.*, 2011). Segundo a resolução da CONAMA 357/2005, referente aos padrões de qualidade para classe de águas doce, atribuí valores máximos permitido de simazina 2,0 µg/L. Portanto, o monitoramento desse contaminante meio ambiente é muito importante.

A análise de defensivos agrícolas é difícil de ser executada, uma vez que esses compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas e podem ser dificultadas por compostos interferentes, além de serem caras e demandarem um grande tempo de análise. Os biossensores são úteis para este fim, pois apresentam características importantes como: automação, miniaturização, baixo custo, seletividade, sensibilidade e rapidez de análise e portabilidade (Silva *et al.*, 2011; Pathak *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Esses dispositivos podem ser confeccionados utilizando-se agentes biológicos, tais como, enzimas, células, microorganismos, anticorpos, mediante a um transdutor eletroquímicos, ópticos, piezelétricos ou calorimétricos.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor amperométrico, que pode ser confeccionado de forma simples e barata, utilizando como biocomponente enzima peroxidase, extraída de feijão (*Phaseolus vulgaris*. L) que será imobilizada em bastão de grafite.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração, pré-purificação e caracterização da peroxidase do extrato bruto no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Preparação do extrato protéico de feijão: 50,0 g dos pós obtidos da casca e da polpa do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), por trituração, foram homogeneizados em 150 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0, centrifugados a 10.000 rpm a 0°C e armazenados em geladeira a 4°C para posterior análise da atividade. Os extratos (homogeneizados) obtidos foram denominados, peroxidase solúvel da polpa (PSP) e peroxidase solúvel da casca (PSC).

Determinação da atividade enzima peroxidase: A atividade da peroxidase solúvel presente no feijão foi determinada em espectrômetro de UV-visível (Shimadzu UV-1800), pela medida de absorbância em 470 nm. O tetraguaiacol formado após reação entre 2,0 ml da solução de guaiacol 0,2 M; 0,5 ml de H₂O₂, 3% e 0,5 mL do extrato enzimático diluído 1:10, em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 a 25°C. Uma unidade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima que provocou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto de reação, nas condições experimentais. A atividade foi calculada pela equação 1:

$$U = \Delta Abs. \times 1000 \times FD / \Delta t \times V_{amostra} \quad (1)$$

Onde: U = atividade (U/ml), ΔAbs = variação da absorção, FD = fator de diluição, Δt = variação do tempo e $V_{amostra}$ = volume da amostra

Estudo da influência do pH na extração da enzima peroxidase: A atividade enzimática em função do pH, foi determinada usando-se solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, na faixa de pH entre 5,0 a 8,0.

Influência da adição de Polivinilpirrolidona (PVP) na atividade enzimática: Avaliou-se o efeito da adição polivinilpirrolidona no desempenho da atividade da peroxidase, variando a concentração do polímero. Para isso foram adicionados os percentuais de 10%, 20%, 30%,

40% e 50% em relação a massa de feijão. O polímero foi removido após centrifugação a 1200 rpm a 0°C.

Pré-purificação com sulfato de amônio: 50 mL do extrato bruto foi submetido a um processo de concentração que consistiu de precipitação com sulfato de amônio nos percentuais de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, sob agitação a uma temperatura de 0°C. O sobrenadante obtido após centrifugação foi recuperado e novamente adicionada a massa de sulfato de amônio de forma sequencial. O precipitado foi ressuspensão em 5,0 mL de tampão 0,2M pH 6,0 para posterior análise de atividade enzimática.

Determinação de proteína total – Método de Bradford : As quantificações das proteínas totais nos extratos foram realizadas empregando-se a metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de UV-visível na região de 595 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de BSA (albumina soro bovino) a 1%, sendo o teor protéico da amostra expresso em mg de proteína.

Caracterização da enzima peroxidase por eletroforese SDS-PAGE: Para as análises de proteínas solúveis, a eletroforese foi realizada em gel de poliácridamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), para caracterização da peroxidase de acordo com o método descrito por LAEMMLI, (1970).

3. Testes iniciais realizados para construção do biossensor

Voltametria cíclica utilizando bastão de grafite: O biossensor proposto é constituído por um bastão de grafite (2.0 mm HB, marca Faber-Castell®) utilizado como eletrodo de trabalho, onde a enzima peroxidase será imobilizada e testada em solução de fenol. O teste inicial de voltametria cíclica, usando o bastão de grafite, foi realizado avaliando a influência das velocidades de varredura em solução de $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$, 6,0 mM em KCl 1,0 mol.L⁻¹. O sistema eletroquímico é composto de um eletrodo de referência Ag|AgCl(KCl_{sat}) e o eletrodo auxiliar de platina, acoplado a um potenciostato/galvanostato, Autolab PGSTAT 302.

3.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Atividade enzimática da peroxidase

Os valores de atividade enzimática obtidos para casca (PSC) e polpa (PSP) foram respectivamente, 37 U/mL ± 1,412 e 227 U/mL ± 2,123. Os resultados mostram que a casca do feijão apresenta um baixo teor da enzima peroxidase e consequentemente uma baixa atividade, sendo que a maior atividade da enzima está presente na polpa (PSP). Assim para construção do biossensor somente a polpa do feijão será utilizada como fonte enzimática, a casca será descartada na etapa de trituração.

3.2 Efeito do pH na atividade enzimática

Pode-se observar na Tabela 1, que a enzima apresenta uma maior atividade em pH 6,0. O melhor desempenho neste pH pode está relacionado com a maior proximidade ao ponto isoelétrico da peroxidase, gerando condição favorável a estabilidade. Observa-se que em valores de pH acima de 6,0 a enzima pode está sendo induzida a desnaturação protéica. A

partir destes experimentos padronizou-se a extração da enzima peroxidase em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 para todos os demais experimentos.

Tabela 1. Influência do pH na extração da enzima peroxidase

pH	Atividade (U/mL)
5,0	942±2,12
6,0	1403±3,53
6,5	179±4,94
7,0	180±0,70
8,0	158±2,82

3.3 Efeito da adição de polivinilpirrolidona (PVP) na atividade da enzima peroxidase

A adição de polivinilpirrolidona tem sido utilizada para estabilização de enzimas promovendo a remoção de compostos fenólicos naturais, durante a obtenção dos extratos brutos. Essa remoção ocorre devido à formação de ligações pontes de hidrogênio nestes compostos, causadores do escurecimento do extrato do feijão. Devido sua baixa solubilidade, o polímero é recuperado na etapa de centrifugação na forma de precipitado. Assim a fim de avaliar o comportamento da atividade da enzima peroxidase na etapa de extração, foram adicionados diferentes percentuais de PVP em relação à massa do feijão, conforme mostra a Figura 1.

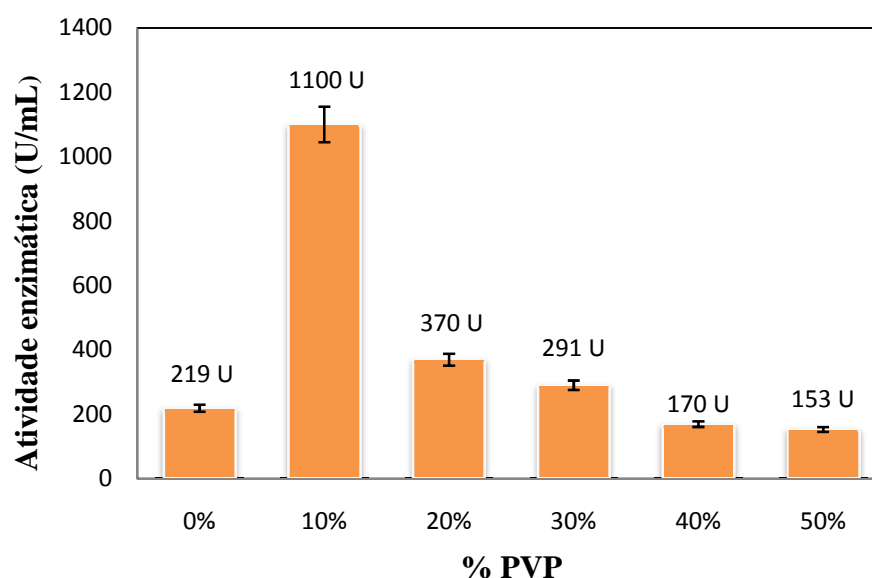


Figura 1. Atividade da enzima peroxidase dos extratos brutos obtidos em diferentes percentuais de polivinilpirrolidona.

Conforme mostra a Figura 1 a quantidade ideal de PVP para se obter melhor atividade da peroxidase presente no extrato bruto foi de 10% em relação a massa de 50 g do pó de feijão, apresentando atividade total de 1100 U/mL. Esse percentual foi mantido na preparação dos extratos aplicados na construção do biossensor.

3.4 Pré-purificação com sulfato de amônio e adição de polivinilpirrolidona (PVP).

A fim de concentrar e estabilizar a enzima peroxidase presente no extrato bruto do feijão, para aplicação no biossensor, o extrato bruto foi pré-purificado de forma sequencial com sulfato de amônio. Também avaliou-se o efeito provocado pela adição de PVP ao extrato bruto, seguido da pré-purificação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Tabela 2.

Observa-se o aumento significativo na atividade total (U_T) da enzima no intervalo de saturação de 20-40% para ambos os extratos, apresentando valores de 3135 U/mL e 1336 U/mL, respectivamente, para extrato bruto com PVP (EB-PVP) e extrato bruto sem PVP (EB). Esse aumento de atividade pode ser atribuído a eficiência do PVP, pois esse polímero possui a capacidade proteger a enzima de reações com substratos naturais presentes o tecido do feijão.

Para os percentuais de 20-40% (E.B) e 40-60% (E.B-PVP) onde apresentaram fator de recuperação de 102,50 % e 138,78 % indica que houve ativação da enzima, podendo ser atribuído a remoção de inibidores presentes no material inicial. A adição de polímero apresentou melhor atividade específica de 175,78 U/mg favorecendo um aumento de 57,66 % em relação a atividade específica obtida, sem sua adição. O enriquecimento enzimático, pode ser observado considerando que a atividade específica está diretamente relacionada com a pureza da enzima, apresentando um percentual de 1,387% para o fator de purificação (F.P)

Tabela 1. Avaliação da pré-purificação da enzima peroxidase utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Homogeneizado sem adição de PVP	U_T (U/mL)	P_T (U/mg)	U_E (U/mg)	F.R (%)	F.P (%)
E. B	1322±4,50	12,13±0,03	108,99	100	1
0-20%	526±10,50	10,96±0,13	47,99	44,04	0,440
20-40%	1336±2,50	11,96±0,14	111,71	102,50	1,024
40-60%	130±0,50	4,63±0,02	28,08	25,76	0,257
60-80%	22±3,50	2,40±0,10	9,17	8,41	0,084
80-100%	ND	ND	-	-	-
S	ND	ND	-	-	-

U_E – Atividade específica, U_T – Atividade total, P_T – proteína total, F.R – Fator de recuperação e F.P – Fator de purificação. ND- Não detectado.

Tabela 2. Avaliação da pré-purificação da enzima peroxidase utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e PVP

Homogeneizado com adição de PVP	U_T (U/mL)	P_T (U/mg)	U_E (U/mg)	F.R (%)	F.P (%)
E.B-PVP	1417±4,949	11,187±0,09	126,66	100	1
0-20%	690±2,121	9,677±0,04	71,30	56,29	0,562
20-40%	3135±3,535	27,342±0,03	114,66	90,52	0,905
40-60%	2253±8,485	12,817±0,24	175,78	138,78	1,387
60-80%	996±2,828	9,617±0,18	103,57	81,76	0,817
80-100%	192±7,770	2,342±0,02	81,98	64,72	0,647
S	449±1,414	5,507±0,07	81,53	64,37	0,643

U_E – Atividade específica, U_T – Atividade total, P_T – proteína total, F.R – Fator de recuperação e F.P – Fator de purificação.

3.5 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

Para as frações obtidas na precipitação de proteínas observou-se a presença de uma banda mais intensa com peso molecular próximo de 40 kDa, que comparando com o padrão comercial, pode ser relacionado com a isoenzima peroxidase. A massa molar da peroxidase presente no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi determinada através da curva de calibração obtida pela mobilidade dos padrões de massa moleculares pelas equações (2) e (3)

$$\text{Log } M_r = -a (R_f) + b \quad (2) \quad \text{e} \quad M_r = e^{-a (R_f) + b} \quad (3)$$

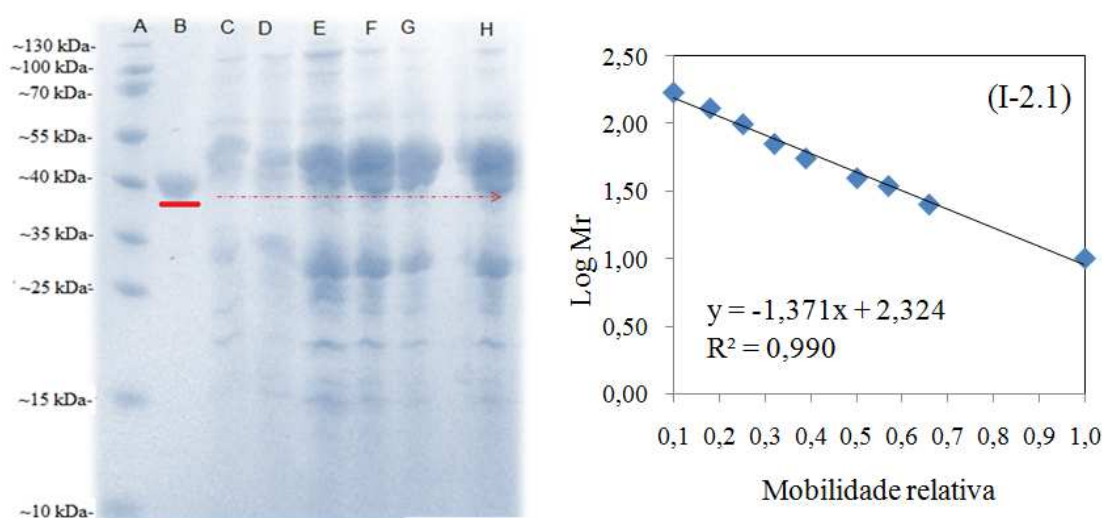


Figura 2. Perfil protéico dos extratos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) dialisados. (A) Marcadores de peso molecular dos padrões de proteínas (kDa), (B) Peroxidase *horseradish silvestre* (Sigma-Aldrich), (C) Fração de 0-20%, (D) Fração de 20-40%, (E) Fração 40-60%, (F) Fração 60-80%, (G) Fração 80-100%, (H) Extrato bruto do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). (I-2.1) Curva de calibração com padrões os protéicos.

A massa molar obtida para peroxidase comercial e a extraída do feijão (*Phaseolus vulgaris. L*), foi respectivamente, $\sim 44,00$ kDa e $\sim 41,68$ kDa, valor este que estão de acordo com dados da literatura (Nunes, 2011; Sigma, 2014).

3.6 Análise por voltametria cíclica utilizando bastão de grafite

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em intervalo de potencial de $-0,2$ a $+0,8$ V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol/L). Inicialmente foi avaliado a influência na velocidade de varredura de 50, 100, 150, 200 e 300 mV/s, utilizando o bastão de grafite previamente lixado em solução de $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ 6,0 mM em KCl 1,0 mol.L⁻¹, conforme mostra Figura 3.

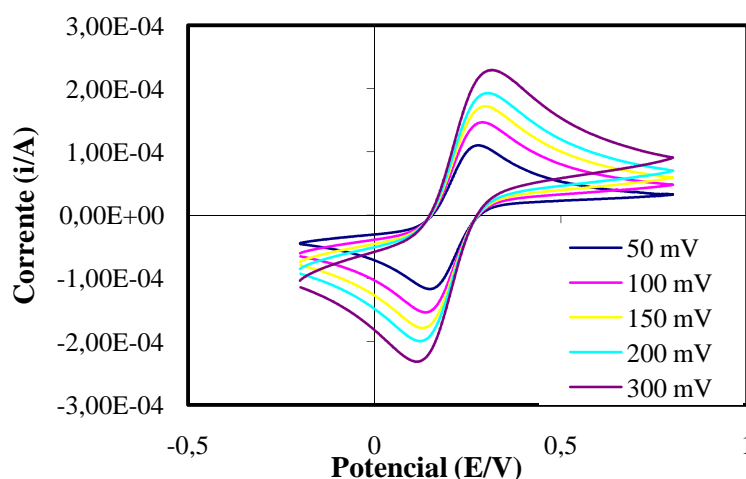


Figura 3. Voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura, utilizando bastão de grafite lixado em solução eletrolítica de $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$.

Nos perfis voltamétricos obtidos mostram que o eletrodo de trabalho apresenta correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) bem mais definidos utilizando varredura de 50 mV/s. Essa velocidade foi padronizada em todos os experimentos para estudo do biossensor amperométrico.

4. CONCLUSÃO

A construção de um biossensor enzimático a partir de feijão torna-se economicamente viável, por ser uma fonte enzimática de baixo custo e que possui procedimentos de extração e concentração, relativamente simples. O uso de um bastão de grafite permite a imobilização da enzima, que em solução contendo fenol e em presença do inibidor simazina, pode ser usada para detectar a presença de agrotóxicos. Essa detecção é obtida através de valores de corrente catódica em amostras líquidas. Estes estudos estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Sensores Biológicos na Escola de Química, UFRJ.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento deste trabalho e também ao INMETRO e FAPERJ pelas bolsas concedidas.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>>. Acesso em: 4/4/2014..

BRADFORD, MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

GARCÍA, M. Á.; SANTAUFEMIA, M.; MELGAR, M. J. Triazine residues in raw milk and infant formulas from Spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. *Food and Chem. Toxicology*, v. 50, n. 03-04, p. 503-510, 2011.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem Rev.*, v.109, n.5, p.1948-1998, 2009.

NUNES VIEIRA, S. Desenvolvimento e Caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensor eletroquímico na detecção de derivados fenólicos. Tese de Doutorado, p. 127, 2011

OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento do dicofol e da atrazina nos processos de tratamento de esgoto por lodo ativado e de pós-tratamento do lodo por biodigestores anaeróbios. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *Azoojono Journ. of Nanotech.* Online, v.3, set 2007.

RICHARDSON, M.L. & GANGOLLI, S. The dictionary of substances and their effects. Cambridge, royal society of chemistry, 1994, p.44-47

SIGMA. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8375?llang=pt®ion=Br>>. Acesso em 4/4/2014.

SILVA, L. M. C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Tese (Doutorado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 153 p, 2011

WERBER, J.B. Properties and behaviour of particles in soil. in: honeycutt, r.c. & schabacker, j., eds. mechanism of pesticide movement into ground water. London, crc press, inc., 1994. p.21.