



POLISSACARÍDEO DE CAJU ARBÓREO DO CERRADO (*Anacardium othonianum* Rizz.) E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO DE PEROXIDASE (HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)).

¹Aline Rodrigues dos Santos* (IC), ¹Thâmara Machado e Silva (PG), ¹Samantha Salomão Caramori (PQ).

¹Universidade Estadual de Goiás - Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG, Anápolis, Goiás.

Resumo: Enzimas imobilizadas são aquelas que estão fisicamente localizadas ou confinadas numa região do espaço, com retenção de suas propriedades catalíticas, e que podem ser utilizadas repetidamente e continuamente. Visando a grande capacidade do uso de enzimas imobilizadas o presente trabalho utilizou a enzima peroxidase imobilizada em polímeros biodegradáveis que tem grande potencial para uma imobilização já que pode ser encontrada em vários vegetais e catalisa a oxidação de mono, di e polifenóis em presença de peróxido de hidrogênio. Esse sistema, produzido em escala laboratorial, tem como objetivo ser capaz de tratar efluentes com resíduos industriais, removendo compostos fenólicos. Foram realizadas análises de espectro de infravermelho, estudos de imobilização por adsorção física e por ligação covalente, tempo de armazenamento, capacidade de reutilização e remoção de compostos fenólicos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que aqueles processos que ocorreram por ligação covalente apresentaram maior desempenho que aquelas por adsorção física, com os dois polímeros utilizados.

Palavras-chave: Enzimas imobilizadas.

Introdução

Enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas, aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, meio iônico (DIXON; WEBB, 1979). A enzima peroxidase (EC 1.11.1.7) merece destaque por ser encontrada em vários vegetais e catalisa a oxidação de mono, di e polifenóis em presença de peróxido de hidrogênio, oxidando-os e levando ao aparecimento de substâncias coloridas, num processo denominado escurecimento enzimático. Estas enzimas estão largamente presentes na natureza.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão, Cultura e
Assuntos Estudantis



Universidade
Estadual de Goiás



Enzimas imobilizadas são aquelas que estão fisicamente localizadas ou confinadas numa região do espaço, com retenção de suas propriedades catalíticas, e que podem ser utilizadas repetidamente e continuamente (CHIBATA, 2006). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar vantagens como: a reutilização das enzimas, o aumento da estabilidade enzimática, redução de custos, desenvolvimento de sistemas contínuos, efluentes livres de catalisadores, maior versatilidade na etapa de separação, facilidade de automação e controle possibilidade de utilização das enzimas “in-natura” (GOY et al., 1992). Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização. Polímeros biodegradáveis têm gerado interesse significativo na pesquisa e comunidades industriais, uma vez que sua degradação ligada às suas origens renováveis, promove um reduzido acúmulo de resíduos e tensão ambiental, degradando-se mais facilmente durante todo o processamento industrial (CHOONG; FOCATIIS, 2016). A utilização de polissacarídeos exsudados de plantas, como o polissacarídeo de Caju arbóreo do Cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) como suporte para imobilização de peroxidases, tem se mostrado atrativa, uma vez que estes materiais são facilmente recuperados por centrifugação ou por simples precipitações em solventes orgânicos, como etanol (SILVA et al., 2010). As estratégias de posicionamento da indústria de enzimas imobilizadas dependem diretamente do avanço de investigação em áreas relacionadas com a estabilização enzimática, entre elas a estabilização da peroxidase que se torna uma enzima importante para a catálise de dejetos industriais tóxicos para o meio ambiente. Assim, propõe-se neste projeto a utilização de uma peroxidase amplamente conhecida para degradação de compostos fenólicos, imobilizada em um suporte biodegradável, obtido de forma sustentável, para a construção de sistemas para tratamento de resíduos industriais de amostras de água.

Material e Métodos





- 1) Origem e purificação do polissacarídeo: A goma in natura (G) foi obtida por meio de incisões nos troncos de cajueiros, implantados na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), em Goiânia, GO. O bagaço de cana-de-açúcar foi adquirido no mercado local da cidade de Anápolis, Goiás.
- 2) Caracterização da Goma in natura (G), do Polissacarídeo (PEJU-GO) e do bagaço de cana: As amostras de goma de caju do Cerrado (G) e de polissacarídeo precipitado (PEJU-GO) e as amostras de bagaço de cana foram analisadas por espectrometria de infravermelho (FTIR) com pastilhas de KBr, com a varredura feita na faixa entre 4000 a 500 cm^{-1} . Os espectros foram comparados para caracterização dos grupos químicos presentes nas amostras.
- 3) Atividade Enzimática de Peroxidase (Horseradish peroxidase – HRP): A atividade enzimática foi determinada pelo método de Halpin e Lee (1987), utilizando-se pirogalol e peróxido de hidrogênio como substratos. Após 1 min de reação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância a 420 nm, considerando-se 0,1 absorvância /min o equivalente a uma unidade de peroxidase (U).
- 4) Testes de Imobilização das Peroxidasas: A imobilização da HRP foi realizada adicionando-se 250 μL de solução enzimática em 10 mg de PEJU-GO, com reação de 2 horas a 4 °C. Em seguida o PEJU-GO/HRP foi precipitado com etanol absoluto gelado, (-10 °C), centrifugado e testado quanto à atividade enzimática imobilizada. O teste de atividade consistiu em adicionar ao complexo PEJU-GO/HRP os mesmos volumes dos reagentes utilizados para medida da atividade da peroxidase livre. A imobilização da HRP em bagaço de cana foi realizada adicionando-se 1000 μL de solução enzimática em 2,5 mg de bagaço de cana com reação de 2 horas a 4 °C. Em seguida o BC-HRP foi centrifugado e testado quanto à atividade enzimática imobilizada, da mesma forma que se fez com o complexo PEJU-GO/HRP.

Resultados e Discussão

Os espectros de infravermelho do bagaço de cana bruto e do tratado com periodato de sódio (Figura 1) mostraram picos mais fortes em 3428 e 1048 cm^{-1} ,

caracterizando estiramentos de grupo OH e COH, respectivamente. Houve o aparecimento de bandas entre 2918 e 2850 cm^{-1} , característico do espectro de hemicelulose conforme também relatado por Fan et al. (2012). O bagaço de cana tratado com periodato de sódio (Figura 1, linha tracejada) apresentou bandas próximas de 1740 e 880 cm^{-1} , com forte pico em 1728 cm^{-1} , característica de grupos carbonila (CALVINI et al., 2006). Tanto o material bruto quanto o tratado exibiram bandas características de fibras lignocelulósicas.

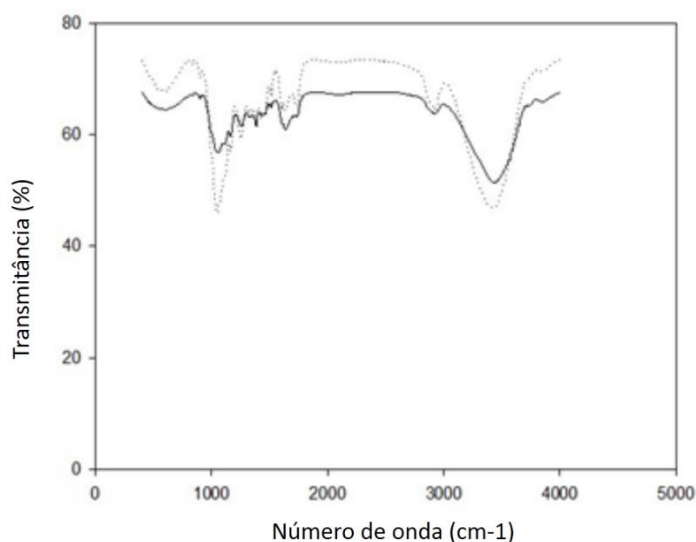


Figura 1 – Espectros na região do infravermelho de bagaço de cana-de-açúcar bruto (linha cheia) e tratado com periodato de sódio (linha tracejada).

Para iniciar os testes de imobilização foram realizados testes de atividade de peroxidase com diferentes diluições, apresentados na Figura 2. Como pode ser observado, a quantidade de 250 uL apresentou valores de atividade elevados, se comparados aos obtidos com as demais diluições, e por isto foi o parâmetro escolhido para ser utilizado nos demais experimentos.

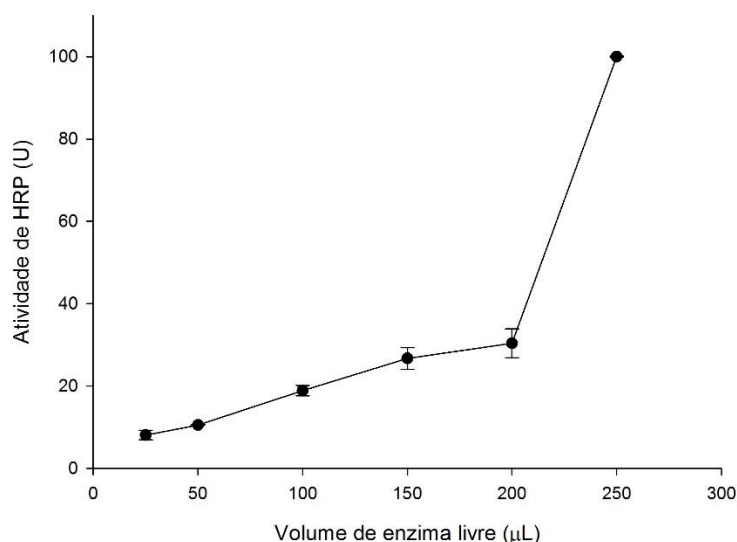


Figura 2 – Relação entre a quantidade de peroxidase (HRP) livre e a atividade observada.

Os testes de imobilização de peroxidase mostraram que o tratamento do bagaço de cana com periodato de sódio foi um método mais eficaz para a retenção de enzima ativa, em todas as quantidades de suporte testadas (Figura 3). A adsorção física da enzima ao bagaço de cana apresentou desempenho semelhante ao sistema contendo o suporte modificado apenas na concentração de 5 mg. Por esta razão optamos por seguir os experimentos utilizando o sistema bagaço de cana-periodato-HRP.

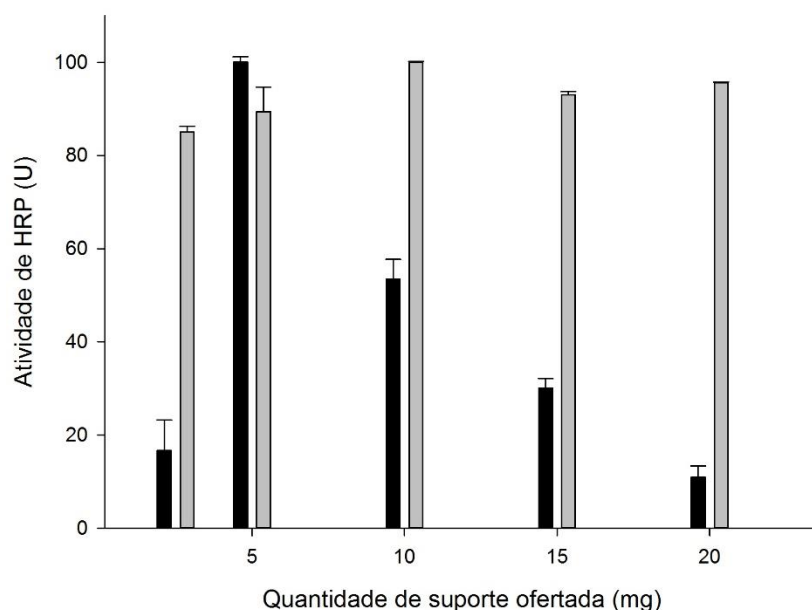


Figura 3 – Capacidade de imobilização de peroxidase (HRP) pelo bagaço de cana por adsorção física (preto) e por ligação covalente via periodato de sódio (cinza).

Os estudos de imobilização enzimática no polissacarídeo de caju-arbóreo-do-Cerrado conduzidos por adsorção física de HRP (PEJU-GO-HRP) resultaram em 21 U imobilizadas, correspondendo a 75% de rendimento de imobilização. A imobilização por ligação covalente via tratamento com periodato de sódio (PEJUp-GO-HRP) resultou em 27 U, ou seja, 93% de rendimento de imobilização. A adsorção física é principalmente baseada na interação eletrostática entre a biomolécula e a superfície da matriz devido à diferença de pontos isoelétricos; na ligação covalente ocorre a formação de uma ligação através de uma terceira molécula que atua como uma ponte entre a matriz e o receptor (KAURA et al., 2016). A formação de múltiplos pontos de ligação neste último caso deve ter favorecido um maior rendimento no processo de imobilização pelo suporte tratado com periodato de sódio.

Os complexos de HRP imobilizada em PEJU-periodato e bagaço de cana-periodato foram testados quanto à estabilidade ao armazenamento. Os dados estão apresentados na Tabela 1. Percebe-se que ao longo do tempo de armazenamento o bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de manter maior quantidade de enzima ativa. Em termos relativos, o complexo BCp-HRP manteve 70 vezes mais enzima ativa após 30 dias de armazenamento do que PEJUp-HRP, nas mesmas condições.

Tabela 1 - Estabilidade ao armazenamento dos complexos PEJU-HRP and BCp-HRP.

		Atividade remanescente (%)	
		PEJUp-HRP	BCp-HRP
Tempo	1	100	100
(dias de	3	71,4	65,7
armazenamen	6	25,6	69,3
to)	9	20,6	42,4



12	10,4	43,6
15	6,0	56,6
18	1,1	64,6
21	0,9	57,7
24	0,9	56,2
27	0,9	46,6
30	0,6	41,8

Uma das características principais almejadas no desenvolvimento de sistemas de enzimas imobilizadas é a sua capacidade de reutilização. Após oito ciclos repetidos de uso do mesmo material, o complexo PEJUp-HRP reteve apenas 2,2% de enzima ativa, enquanto BCp-HRP não foi capaz de reter atividade de HRP em relação ao primeiro uso.

Os complexos contendo HRP imobilizada foram testados quanto à capacidade de degradação de compostos fenólicos em laboratório. Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

Percebe-se que, utilizando a mesma enzima, mas imobilizada em polímeros diferentes, é possível obter desempenhos também diferentes quanto à capacidade de degradação de fenóis. Além disso, apenas o sistema PEJUp-HRP pôde degradar os compostos presentes em misturas complexas, como o efluente da Estação de Tratamento do Distrito Agroindustrial (ETE-DAIA) e o efluente têxtil.

Tabela 2 – Capacidade de remoção de compostos fenólicos apresentada pelos complexos PEJUp-HRP e BCp-HRP.

	Remoção de Fenóis (%)	
	PEJUp-HRP	BCp-HRP
Bromofenol	6	7,56
Catecol	12	11,44



Nitrofenol	0	31,08
Pirogalol	15	32,93
ETE-DAIA	16	0
Efluente têxtil	53	0

Considerações Finais

Os dados produzidos neste relatório demonstram que a enzima peroxidase (HRP) foi imobilizada em diferentes materiais poliméricos naturais, sendo que aqueles em que o processo ocorreu por ligação covalente apresentaram maior desempenho.

Ambos os complexos foram capazes de remover compostos fenólicos em escala laboratorial e, sendo sistemas naturais, é possível que se apresentem como alternativas biodegradáveis ao tratamento de efluentes industriais.

Agradecimentos

Agradeço a minha professora orientadora Samantha Salomão Caramori pela, orientação e oportunidade de realização desse trabalho. À professora Thâmara Machado e Silva, pela grande ajuda, atenção, apoio à realização desse trabalho e ao CNPq pelo investimento

Referências

- CALVINI, P.; GORASSINI, A.; LUCIANO, G.; FRANCESCHI, E. FTIR and WAXS analysis of periodate oxycellulose: Evidence for a cluster mechanism of oxidation. *Vibrational Spectroscopy*, v. 40, p. 177-183, 2006.
- CHIBATA, I. Industrial applications of immobilized enzyme systems. *Pure & Appl. Chem.* v. 50, p. 283-290, 2006.



CHOONG, G.Y.H.; FOCATTIS, D.S.A. A method for the determination and correction of the effect of thermal degradation on the viscoelastic properties of degradable polymers, *Polymer Degradation and Stability* 130; 182 -188; 2016.

DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*, New York: Academic Press, 1979.

FAN, M., DAI, D., HUANG, B., 2012. Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibers. In: SALIH, S.M. (Ed.), *Fourier Transform – Materials Analysis*, ISBN: 978-953-51-0594-7, InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/fourier-transform-materials-analysis/fourier-transform-infraredspectroscopyfor-natural-fibres>

GOY, P.A; FÉLIX, G; MÉTRAUX, J.P; JR. MEINS, F. Resistance to Disease in the Hibrid Nicotina glutinosa X Nicotina debneyi is Associated With High Constitutive Levels of β -1,3-glucanase, Chitinase, Peroxidase and Polyphenoloxidase; *Phys. Mol. Plant Path*, v. 41, p.11-21, 1992.

HALPIN, B.E.; LEE, C.Y. Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *Journal of Food Science*, v. 52, n 4, p. 1002-1005, 1987.

KAURA, G.; SAHAB, S.; TOMARC, M.; GUPTAA, V.; Influence of immobilization strategies on biosensing response characteristics: A comparative study. *Enzym. Microb. Technol.* v.82, p.144–150, 2016.

SILVA, T. M.; SANTIAGO, P. O.; PURCENA, L. L. A.; FERNANDES, K. F. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization — Structural characteristics, stability and recovery, *Materials Science and Engineering: C*, v. 30, n. 4, p. 526-530, 2010.