

Imobilização de HRP em polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. para biocatálise em meio não-convencional

I-Introdução:

Enzimas ocupam uma posição única na síntese química, devido à alta seletividade e rápida catálise acima das condições ambientes de reações (Krishna, 2002) podendo ser modificadas com boa estabilidade através de técnicas de imobilização para recuperar a biocatálise e melhorar a estabilidade através de condições não usuais como as usadas em catálise orgânica. A imobilização de enzima é um excelente método que permite alta estabilidade de armazenamento, melhor controle do processo catalítico, estabilidade operacional e redução da contaminação da solução de tratamento da enzima, uma vez que enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas da solução (Queiroz *et al*, 1999). Novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Nascimento, 2004). A catálise enzimática em meio orgânico tem gerado enormes potenciais no uso de enzimas para propostas sintéticas, industriais e particularmente analíticas (Adeyoju *et al*, 1994). Das enzimas conhecidas e trabalhadas, a horseradish peroxidase (HRP) é conhecida por ter uma alta atividade e estabilidade em meio não-aquoso e é a mais bem estudada de todas as peroxidases (Adeyoju *et al*, 1994). Peroxidase e grande parte de outras enzimas são conhecidas por requererem adição de água para atividade em solventes não-aquosos (Adeyoju *et al*, 1994) justificando-se o uso do polissacarídeo de caju (*Anacardium occidentale* L.) como suporte para imobilização desta enzimas e sua aplicação em meio orgânico, uma vez que o próprio suporte é capaz de promover a hidratação da enzima, visto que a água, sendo crítica para esta, é capaz de afetar, quer influenciando sua estrutura via ligação covalente e rompendo as ligações hidrogênio, facilitando a difusão do reagente quer influenciando o equilíbrio da reação.

II - Metodologia:

A ativação do suporte é feita quando 10 mL de uma solução de polissacarídeo de caju (CGP) (5,0 mg mL⁻¹) preparada em tampão fosfato de sódio 0.1 mol L⁻¹ pH 7,0 reage por 30 min, em temperatura ambiente, com 2 mL de periodato de sódio 0.1 mol L⁻¹. A solução é precipitada com etanol absoluto na proporção de 1:3 (v/v), sendo o precipitado seco, triturado e armazenado a 4°C. Para o ensaio de imobilização de HRP, 1000µL de uma solução de enzima contendo 24 UE mL⁻¹ são mantidos sob agitação a 4°C, por 30 min, com 15 mg de CPG ativado com periodato. A atividade enzimática é testada após 1 min de reação usando pirogalol (0.07mol L⁻¹) e H₂O₂ (0.05mol L⁻¹), pH 6.0. Após a imobilização, solventes orgânicos como etanol, isopropanol, acetoneitrilla, acetona, éter etílico, clorofórmio, hexano e dimetilsulfóxido (DMSO) são utilizados para definir a melhor condição de precipitação. Alíquotas de 100µL da enzima nativa são mantidas em solução destes solventes na mesma proporção usadas para a imobilização, em tempos de incubação que variam de 30, 60, 90 e 120 min. Após a precipitação com os solventes orgânicos e a centrifugação do suporte-enzima (CGP-HRP) por 20 min, o solvente é removido e o suporte-enzima dissolvido no meio de reação pra ensaio de atividade. O CGP-HRP é precipitado novamente com o mesmo solvente e separado do meio de reação como descrito. Este procedimento segue-se repetidamente.

III – Resultados e discussão:

Dos solventes orgânicos utilizados, o melhor resultado obtido foi com a utilização de acetona para a precipitação do CGP-HRP, com manutenção da atividade enzimática em 100% no segundo uso. Cada uso possui um tempo de cerca de 30 min, correspondendo a um total de 180 min de exposição ao meio orgânico. Neste intervalo, a enzima nativa

(livre) perde totalmente a atividade. Em ordem decrescente, o tratamento com os solventes resultou na manutenção de 93,3% da atividade com isopropanol, 42,4% com DMSO, 20,2% para éter etílico, 17,6% com etanol, 9,6% com acetonitrila, 8,7% para hexano e 1,3% para clorofórmio. O melhor resultado de reusabilidade obtido para CGP-HRP mostrou-se com a acetona e fosfato de sódio na precipitação da enzima imobilizada; nestas condições, CGP-HRP foi utilizado três vezes com 100% da atividade, com decréscimo de 37% da atividade após quatro usos .

IV – Conclusão:

Os solventes testados para precipitação de CGP-HRP permitiram simultaneamente avaliar a recuperação do suporte e a resistência da enzima imobilizada exposta ao ambiente orgânico. Os resultados do trabalho são promissores, indicando que o polissacarídeo de caju (*Anacardium occidentale*, L.) é um excelente suporte para a biocatálise com HRP em meio não convencional, orgânico ou em alta concentração de sal, pois é capaz de resguardar a camada de solvatação da enzima durante a precipitação com solvente orgânico, e simultaneamente facilitar difusão do reagente no ambiente hidrofílico de reação.

V - Referências bibliográficas:

- 1) Adeyoju, O.; Iwuoha, E.I. and Smyth M.R.; Determination of kinetic parameters for the inhibitory effects of organic sulphides on an amperometric peroxide biosensor in non-aqueous media; *Talanta*, vol 41, nº 9, pp. 1603-1608, 1994.
- 2) Aksoy, S.; Tümtürk, H.; Hasirci, N.; Stability of α -amylase immobilized on poly (methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres; *Journal of Biotech.*; 1998.
- 3) Krishna, S.H.; Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnology Advances* 20, 239-267, 2002.
- 4) Nascimento, M.G; Soldi, V; Dalla-Vecchia, R.; Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros, *Química Nova*, Vol 27, nº 4, 623-630, 2004
- 5) Queiroz, A.A.A.; Vargas, R.R.; Hiza, O.Z.; Barrak, E. R.; Bechara, E.J.H.; Wlasdislaw, B.; Marzarati, L.; Graft copolymers with immobilized peroxidase for organic synthesis, *Radiation Physics and Chemistry*, 55, 345-352, 1999.