



Adsorção de extrato natural de peroxidase em xerogéis de carbono

Tartuci, L.G.¹; Gorgulho, H.F.¹; Ribeiro, L.S.¹; Martelli, P.B.¹

¹ Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de São João Del Rei, MG. Praça Dom Helvécio 74, CEP 36300-000, São João del Rei, MG, Brasil - Email: leticia tartuci@gmail.com

RESUMO: Neste trabalho foi investigada a imobilização da enzima peroxidase, obtida através do extrato bruto da abobrinha (*Cucurbita pepo*), em xerogéis de carbono obtidos de diferentes precursores. A atividade da enzima foi medida em relação à oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio. A imobilização foi feita pelo método de adsorção física. Todos os carbonos adsorveram mais de 80% da enzima contida na solução inicial. Entretanto a atividade recuperada não foi proporcional à quantidade adsorvida. Verificou-se que a presença de macroporosidade é fator determinante para manter a atividade da enzima imobilizada. Os xerogéis de carbono obtidos a partir de precursores (Furfural) que diminuem a polaridade da superfície do carbono também apresentaram maior atividade para a enzima imobilizada.

PALAVRAS-CHAVE: Xerogel de carbono, Peroxidase, Imobilização

ABSTRACT: The present work investigated the immobilization of crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*), as peroxidase source, on carbon xerogel matrices obtained from different precursors. The peroxidase activity was measured in relation to the guaiacol oxidation products in presence of hydrogen peroxide. The immobilizations were carried out using the method of physical adsorption. All carbons adsorbed over 80% of the enzyme contained in the initial solution. However the activity upon attached on carbons xerogels was not proportional to the amount of enzyme adsorbed. The adsorption results showed that the presence of macroporosity is crucial to preserve the activity of immobilized enzyme on the solid support. Carbon xerogel obtained from precursors (Furfural) that decrease the carbon polarity showed highest activity for the immobilized enzyme.

KEYWORDS: carbon xerogel, peroxidase, immobilization

1. INTRODUÇÃO

Os materiais de carbono nano-estruturados, em especial os xerogéis de carbono (CXs), apresentam grande potencial para aplicação como suporte de catalisadores devido sua estrutura ordenada de poros (mesoporos combinados com micro/macroporos). CXs exibem uma estrutura periódica de poros resultante do empilhamento uniforme de nanoesferas dentro de uma estrutura tridimensional (Pekala, 1992). Além disso, estes carbonos podem ter sua superfície modificada diretamente no processo de síntese, o que é feito da introdução de precursores que introduzam grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos no produto final.

Neste trabalho Xerogéis de Carbonos (CXs) obtidos de diferentes precursores foram utilizados como suporte para adsorção de extrato vegetal contendo a enzima peroxidase. Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações químicas e apresentam uma alta eficiência catalítica e grau de especificidade em relação aos catalisadores de origem sintética. Entretanto, seu uso é restrito por certas propriedades como a não reutilização, instabilidade, alto custo e sensibilidade para inativação. Essas restrições podem ser contornadas através da sua imobilização em suportes sólidos (Nelson, 2002). No processo de imobilização, as enzimas são ligadas a uma matriz sólida, o que diminui a possibilidade de inativação, possibilita a sua separação do meio



reacional e sua reutilização. Pode também proporcionar maior estabilidade, possibilitando faixas mais amplas de pH e temperatura para trabalho e menor interferência de inibidores.

Dentre os diferentes métodos para imobilização, a adsorção física da enzima em um suporte sólido é o mais utilizado devido à sua baixa perturbação sobre a estrutura nativa da enzima, simplicidade, baixo custo e a não introdução de outros reagentes químicos. Neste caso estão envolvidas ligações de baixa energia (ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals), o que traz a desvantagem de favorecer a dessorção caso ocorra grandes variações no pH, natureza do solvente, força iônica e/ou temperatura (Hanefeld, 2009). O procedimento consiste em misturar a enzima e o suporte em condições apropriadas e após um tempo de contato, é feita a separação do derivado preparado. A adsorção é dependente não apenas da natureza da superfície dos CXs como também do solvente e da concentração da enzima.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das amostras

2.2 Preparação das amostras

Os CXs foram obtidos a partir da pirolise dos geis poliméricos preparados a partir das reações de polimerização entre o resorcinol e o formaldeído, usando como catalisador a base Na_2CO_3 (Strelko, 2000). Neste caso o produto final foi denominado XP500. Para se obter CXs contendo nitrogênio na estrutura final, os precursores melanina (M), uréia (U) foram introduzidos na reação acima, obtendo-se os carbonos XM500 e XU500 respectivamente. O furfural foi introduzido para se aumentar a hidrofobicidade da superfície do CXs, obtendo-se o CF500 (Horikawa, 2004).

2.3 Caracterização das amostras

2.3.1 Morfologia

As características morfológicas superficiais foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio

Quanta 200 - FEG - FEI - 2006. As amostras foram presas no suporte de metal da amostra por fita adesiva de carbono.

2.3.2 Propriedades texturais

As áreas superficiais específicas foram determinadas por adsorção de N_2 num Quantachrome Autosorb-1 utilizando o método de BET. O total de poros de volume foi determinado a uma pressão relativa de 0,99. As amostras foram desgaseificada durante 12 h a 573 K, antes da análise. Todas as análises de dados foram realizadas utilizando o NovaWin V.10 © 1997-2007 Quantachrome Instrumentos Software.

2.3.3 Análise Elementar

A determinação do conteúdo de C, N, H e O das amostras foi determinada com um Thermo Scientific Flash 2000 Organic Elemental Analyser. As amostras foram previamente secas a 373 K por cerca de 2 horas, sob vácuo, para eliminar qualquer água adsorvida fisicamente.

2.3.4 Titulação potenciométrica

Para realização da titulação potenciométrica foi utilizado um titulador automático Metrohm Titrando 905 com o software Tiamo 2.2. Utilizou-se um eletrodo combinado de pH da Metrohm e o método de titulação dinâmico, com volumes de 0,01 mL. A determinação dos grupos superficiais de caráter ácido e base foi feita utilizando-se o método já descrito na literatura (Mesquita, 2006).

3.1 Estudo da adsorção do extrato da peroxidase

A enzima utilizada neste trabalho foi a peroxidase obtida através do extrato bruto da abobrinha (*Cucurbita pepo*). O procedimento para a obtenção do extrato bruto como fonte de peroxidase foi baseado no trabalho descrito por Fatibello-Filho e Vieira (2002). A atividade da peroxidase foi determinada pelo método padrão, no qual mede-se a variação de absorvância em 436 nm devido a formação do tetraguaiacol durante a reação enzimática. O cálculo da atividade da enzima é feito de acordo com a Equação 01:



$$\text{Atividade}(U/mL) = \frac{\Delta A_{436/min} \times 4 \times V_t \times f_d}{e \times V_s} \quad (01)$$

Onde:

Vt = volume final da mistura (ml) = 3,00.

Vs = volume da amostra (ml) = 0,1.

e = coeficiente de absorvidade molar do tetraguaiacol (cm²/micro mol) = 25,5.

fd = fator de diluição.

A imobilização pelo método de adsorção física foi feita utilizando-se 100 mg do suporte, o qual foi deixado em contato com 50mL do extrato sob agitação a 100 rpm durante 12h. Após a imobilização, o suporte foi filtrado e lavado com solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ até que esta solução não apresentasse atividade. Após secagem em estufa a 30°C por 1 hora, foi medida a atividade da enzima imobilizada. A atividade da enzima imobilizada foi determinada pelo mesmo processo feito para a enzima livre, utilizando neste caso 10 mg do suporte contendo a enzima imobilizada. A mistura foi mantida sob agitação a 800 rpm (Quimis), uma alíquota foi filtrada a cada 10 min e medida a respectiva absorbância. O cálculo para a determinação da atividade foi realizado como na Equação 02:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\Delta A_{436/min} \times 4 \times V_t \times f_d}{e \times m} \quad (02)$$

Onde:

Vt = volume final da mistura (ml) = 50,0.

m = massa da amostra (g) = 0,01.

e = coeficiente de absorvidade molar do tetraguaiacol (cm²/micro mol) = 25,5.

3.2 Cálculo dos parâmetros da imobilização

3.2.1 Atividade adsorvida (AA)

A atividade adsorvida foi determinada pela relação entre a atividade inicial, medida na solução antes de estar em contato com o suporte, e a atividade final, medida após o contato com o suporte, conforme mostrado na Equação (03):

$$AA (U/g) = (\text{Atividade inicial} - \text{Atividade final}) \times 1000 \quad (03)$$

3.4.2 Rendimento de imobilização (R.I.)

O rendimento de imobilização foi determinado pela relação entre a atividade adsorvida e a atividade inicialmente oferecida, conforme mostrado na Equação (04):

$$R.I. (\%) = (\text{Atividade adsorvida} / \text{Atividade inicial}) \times 100 \quad (04)$$

3.4.3 Cálculo da Atividade Recuperada (AR)

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade adsorvida e a atividade da enzima imobilizada, conforme mostrado na Equação (05):

$$AR(\%) = \frac{\text{Atividade do derivado}(U/g) \times 100}{\text{Atividade adsorvida (U/g)}} \quad (05)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A morfologia das amostras, analisadas por MEV, esta resumida na Figura 1. As amostras CP500 e CU500 apresentam morfologias semelhantes, com aproximadamente mesmo tamanho de esferas, com valores na faixa de 30-50 nm e 50-90 nm respectivamente. No caso de XM500 e XF500 as esferas são muito maiores, com valores na faixa de 800-1000 nm e 1500 – 1900 respectivamente. Estes resultados estão coerentes com os dados de área e porosidade obtidos das isotermas de adsorção de nitrogênio, mostrados na Tabela 1. A porosidade destes carbonos é derivada principalmente dos espaços dentro da partícula, nas partículas maiores a interconexão favorece os macroporos enquanto a interconexão das partículas menores favorecem a mesoporosidade, como propõem o modelo de porosidade descrito por Job *et al.* (2005). Baseado na literatura, o tamanho das partículas está relacionado ao processo de nucleação em meio aquoso. A velocidade de formação dos núcleos pode desfavorecer o crescimento dos centros de polimerização, gerando assim menores partículas. As amostras XM500 e XF500 apresentaram maior tempo de nucleação favorecendo a formação de



partículas maiores. Neste caso as partículas menores formadas inicialmente podem se fundir umas nas outras, formando partículas maiores.

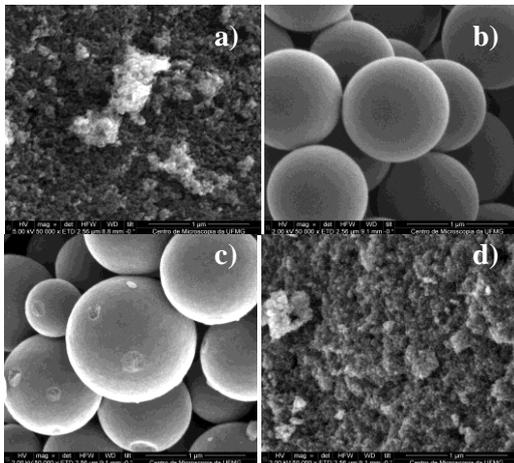


Figura 1. Micrografias para as amostras: a) XU500, b) XM500, c) XF500 e d) XP500.

Tabela 1. Caracterização textural e elemental dos CXs.

Amostra	%N	%C	%O	%H	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)
XM500	6,8	82	9,6	1,6	453	0,35
XU500	4,7	82	12	1,3	632	1,35
XP500	0,0	88	11	1,0	1069	1,17
XF500	0,0	90	9,0	1,0	489	0,32

Os dados de análises elemental e textural dos CXs, resumidas na Tabela 1, confirmam que os carbonos XF500 e XP500 não contêm nitrogênio em sua estrutura. A presença de nitrogênio nestes materiais oferece maior afinidade com a água, pois em geral estão presentes na forma de pirrol e piridina (Gorgulho, 2009). A presença de oxigênio não intensifica necessariamente esta propriedade, pois podem estar na forma funcional de lactonas e carbonilas dentro de uma estrutura condensada onde densidade eletrônica destes grupos distribuída nos anéis aromáticos por ressonância. Nestes casos os carbonos apresentam menor afinidade com solvente aquoso. Os resultados de titulação potenciométrica, Tabela 2, mostram que os carbonos nitrogenados apresentam maior número de grupos ácidos com menor pKa do que os

observados para as amostras XP500 e XF500. Entretanto a amostra XM500 também se caracteriza pela presença de grupos básicos (pKa >9,00).

Tabela 2. Dados dos grupos funcionais ácidos e básicos obtidos da titulação potenciométrica.

Amostra	Grupos funcionais ácidos e básicos (mmol/g)			Total de grupos (mmol/g)
	pKa < 6,0	7,0 < pKa < 9,0	pKa > 9,00	
XM500	0,06	0,10	0,50	0,66
XU500	0,08	0,07	0,06	0,21
XP500	-	0,04	0,76	0,80
XF500	-	0,02	0,44	0,46

A imobilização do extrato enzimático nos suportes de carbono foi feita pelo método de adsorção. O extrato usado neste processo foi analisado quanto à sua atividade antes e após a adsorção. A Figura 2 mostra um típico resultado obtido para as curvas de adsorção da enzima livre.

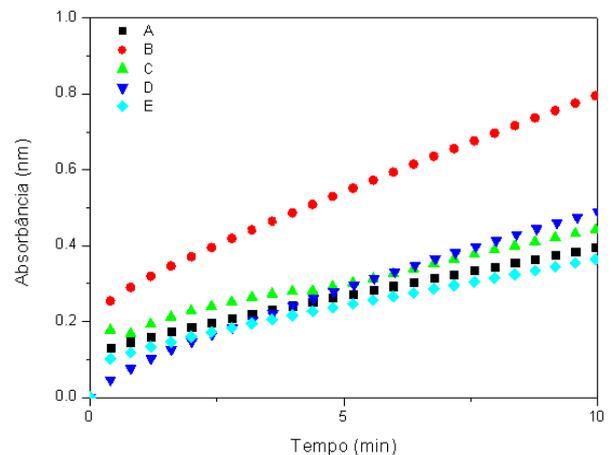


Figura 2. Curva de adsorção obtida para a enzima livre: (A) Atividade enzima livre após adsorção em XP500 (0,2 U/mL); (B) Atividade enzima livre (2,0 U/mL); (C) Atividade enzima livre após adsorção em XF500 (0,14 U/mL); (D) Atividade enzima livre após adsorção em XM500 (0,26 U/mL) e (E) Atividade enzima livre após adsorção em XU500 (0,125 U/mL).

Os valores obtidos para o rendimento da adsorção (imobilização) estão resumidos na Tabela 3.



Tabela 3. Dados relativos à adsorção do extrato natural pelos CXs.

Amostra	Rendimento da Imobilização (%)	Atividade da enzima imobilizada (U/g)	Atividade recuperada (%)
XP500	90	4,0	0,05
XF500	93	13	0,14
XU500	94	2,4	0,03
XM500	87	24	0,30

O primeiro fator importante a ser observado nestes resultados é a alta capacidade de adsorção obtida para estes materiais. Este comportamento se deve à alta área superficial e porosidade destes materiais, os quais se caracterizam por macromeso porosidade facilitando a difusão da solução para os poros internos. Entretanto a atividade da enzima recuperada é inferior ao que foi adsorvido. Este resultado é comumente observado para adsorção de enzimas em suportes e pode principalmente ser devido aos efeitos: i- Estéricos e conformacionais - a enzima é ligada ao suporte pode sofrer alguma mudança na conformação, o que poderá abalar sua eficiência catalítica - como o processo de interação enzima-suporte é quase sempre aleatório, pode ocorrer que a região do sítio ativo se torne menos acessível; ii- De bloqueio dos sítios ativos pelas enzimas ao serem adsorvidas na forma de camadas sobre o suporte (Hanefeld, 2009).

As amostras XF500 e XM500 apresentaram os melhores rendimentos em atividade da enzima, o que foi atribuído principalmente à morfologia caracterizada por esferas maiores, o que favorece a formação de macroporos nas interconexões. Este fator parece ser primordial para preservar a atividade da enzima. A amostra XF500 apresentou melhores resultados de atividade, o que pode ser devido não apenas à sua morfologia como também a contribuição da natureza menos polar de sua superfície.

5. CONCLUSÕES

Extrato natural contendo enzima peroxidase foi imobilizado em CXs obtidos de diferentes precursores. Todos os CXs adsorveram mais 80% da enzima contida na solução inicial. Mas a atividade recuperada não foi proporcional a

quantidade adsorvida. Verificou-se que a presença de macroporosidade é fator determinante na atividade da enzima imobilizada. Além disso, o CX preparado a partir de precursores (Furfural) que diminuem a polaridade da superfície do carbono também favorece a performance da enzima imobilizada.

6. AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa tem apoio das agências de fomento Brasileiras: FAPEMIG, FINEP, CNPq, CAPES, do Instituto de Nanotecnologia do Carbono (INCT) e do Centro de Microscopia da UFMG.

7. REFERÊNCIAS

- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova* 2002, 25(3), 455-464.
- GORGULHO, H.F.; GONÇALVES, F.P.; MANUEL, F.R.; FIGUEIREDO, J.L. Synthesis and characterization of nitrogen-doped carbon xerogels. *Carbon*, 2009, 47:2032 – 2039.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; Understanding enzyme immobilisation, *Chemical Society Reviews*, 2009, 38:453–468.
- JOB, N.; THÉRY, A.; PIRARD, R.; MARIEN, J.; KOCON, L.; ROUZAUD, J. et al. Carbon aerogels, cryogels and xerogels: Influence of the drying method on the textural properties of porous carbon materials. *Carbon*, 2005, 43, 2481–94.
- MESQUITA, J.P.; GORGULHO, H.F.; MARTELLI, P.B. Characterization of Copper Adsorption on Oxidized Carbon. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006,17, 1133-1143.
- NELSON, D.L.; COX, M.M., *Princípios de Bioquímica* 3ªed Servier, 2002.

PEKALA, R.W., ALVISO, C.T., LEMAY, J.D. Organic aerogels: a new type of ultrastructured polymer. In: Hench LL, West JK, editors.

eba 10
2014



X Encontro Brasileiro sobre Adsorção

27 a 30 de Abril de 2014

Guarujá - SP

Chemical processing of advanced materials. New York: Wiley; 1992. p. 671–83.

STRELKO, V. V., KUTS, V. S. & THROWER, P. A. On the mechanism of possible influence of heteroatoms of nitrogen, boron and phosphorus in a carbon matrix on the catalytic activity of carbons in electron transfer reactions. *Carbon*, 2000, 38: 1499-1503.