



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE E INTERCALAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO COM HIDRÓXIDO DE TETRABUTILAMÔNIO



EVALUATION OF ACTIVITY OF POLYPHENOLOXIDASE ENZYME AND INTERCALATION OF THE CALCIUM PHOSPHATE WITH TETRABUTYLAMMONIUM HYDROXIDE

CESÁRIO, Moisés Rômolos¹; MOURA, Danyelle Medeiros de Araújo¹, MACEDO, Daniel Araújo de²; LIMA, Cícero Bosco Alves de³.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Química, Av. Senador Salgado Filho, s/n, CEP 59072-970, Campus Universitário – Lagoa Nova, Natal – RN, Brasil
* e-mail: romolosquimica@hotmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia de Materiais

³ Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Departamento de Química, Rua Almino Afonso, 478, CEP 59610-210, Centro, Mossoró – RN, Brasil

Received 30 March 2010; received in revised form 04 October 2010; accepted 10 October 2010

RESUMO

Os biossensores são dispositivos digitais compostos por semicondutores intimamente ligados a um componente biológico, geralmente uma enzima imobilizada, que são utilizados para medir a concentração de um substrato específico. O presente trabalho teve como objetivos obter e purificar a enzima polifenoloxidase (PFO) obtida a partir do extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*), e estudar a reação de esfoliação do fosfato de cálcio (CaP) com o hidróxido de tetrabutilamônio (TBA⁺OH⁻). O estudo termogravimétrico indicou a formação da fase pirofosfato acima de 400°C não apenas no CaP (branco), mas também no CaP intercalado com TBA⁺OH⁻. Além disso, o CaP intercalado também apresentou perdas de massa entre 350 e 400°C relativas à eliminação do composto orgânico tetrabutilamônio. O valor de atividade enzimática igual a 860,00U/mL (solução tampão 0,10mol.dm⁻³, pH 7) sugere que a enzima extraída do inhame tem afinidade para com o substrato (pirogalol) utilizado neste trabalho, estando apta a ser incorporada nas lamelas no fosfato de cálcio.

Palavras-chave: *Polifenoloxidase, atividade, fosfato de cálcio*

ABSTRACT

Biosensors are digital devices composed of semiconductors connected to a biological component, usually an immobilized enzyme, which are used to measure the concentration of a specific substrate. This study aimed to obtain and purify the polyphenol oxidase enzyme (PPO) obtained from the crude extract of yam (*Alocasia macrorrhiza*), and study the exfoliation reaction of calcium phosphate (CaP) with tetrabutylammonium hydroxide (TBA⁺OH⁻). The thermogravimetric study indicated the formation of the pyrophosphate phase above 400°C not only in CaP (white), but also in intercalated CaP with TBA⁺OH⁻. In addition, the intercalated CaP also presented mass losses between 350 and 400°C related to the elimination of the tetrabutylammonium. The value of enzymatic activity (860.00U / mL, buffer solution 0.10mol.dm⁻³, pH 7) suggests that the extracted enzyme from the yam has affinity towards the substrate (pyrogallol) used in this work. According to this result, it may be incorporated into the lamellae in the calcium phosphate.

Keywords: *Polyphenoloxidase, activity, calcium phosphate*

Introdução

O aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos observado nas

últimas décadas tem causado problemas de poluição ambiental de maneira generalizada praticamente em todas as partes do mundo. A proteção ambiental vem adquirindo grande importância na sociedade contemporânea, que tem cobrado mecanismos rápidos e eficientes de controle dos processos de contaminação ambiental. Neste contexto, o desenvolvimento de biossensores tem sido de fundamental importância para a determinação e quantificação de poluentes de forma rápida e seletiva (Macholan, 1990, Signori *et al.*, 1994).

Os biossensores são dispositivos digitais compostos por semicondutores intimamente ligados a um componente biológico, geralmente uma enzima imobilizada, que são utilizados para medir a concentração de um substrato específico. O sinal gerado pelo dispositivo é diretamente proporcional à concentração do metabólito no fluido biológico. Um analito, ao entrar em contato com o transdutor (composto de um eletrodo de trabalho, uma matriz orgânica ou inorgânica contendo uma enzima imobilizada sobre o eletrodo de trabalho), desencadeia uma reação química gerando um sinal digitalizado pelo transdutor. A digitalização converte a reação química em um sinal elétrico.

Um número considerável de poluentes orgânicos, que se encontram largamente distribuídos no meio ambiente, possui estrutura fenólica. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, detergentes, desinfetantes, refinaria de petróleo e principalmente de papel e celulose. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade, a antraquinona por exemplo, (11th Report on Carcinogens, 2005), e efeitos hepatotóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalizadas nos processos de respiração e fotossíntese (Signori *et al.*, 1994, Rossato *et al.*, 2001).

Deste modo, atualmente existe um

consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos (Fendler, 1996, Freire *et al.*, 2000).

As análises tanto de fenol como de espécies fenólicas podem ser realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Entretanto, estas técnicas não permitem o monitoramento contínuo "*in situ*", pois são de alto custo, lentas, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda da amostra (Rossato *et al.*, 2001).

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado a produção de uma variedade de métodos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento "*in situ*". Fosfatos inorgânicos lamelares são excelentes materiais hospedeiros para imobilização de proteínas e enzimas, são ótimos trocadores iônicos e são capazes de ligar-se a uma variedade de íons metálicos e a cátions orgânicos nas regiões lamelares. O composto fosfato de zircônio, $Zr(HPO_4)_2 \cdot nH_2O$ (ZrP) tem sido bastante estudado e as proteínas redox-ativas citocromo c (cyt c) e *horseradish* – HRP (raiz-forte) são transportadores de elétrons que contêm heme como grupo prostético. O heme é uma molécula de porfirina contendo um átomo de ferro, que na mioglobina e na hemoglobina, permanece no estado ferroso Fe^{2+} . O íon ferro é responsável pela capacidade de transferência de elétrons dessas proteínas (Kim *et al.*, 1997, Durford, 1991, Lima *et al.*, 2004, Lima *et al.*, 2002).

As enzimas são, em sua maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações metabólicas sob diversas condições, tais como, pH, temperatura, concentração e meio iônico. A enzima polifenol oxidase (PFO), presente em grande quantidade de vegetais como inhame, feijão, batata doce, banana, etc, catalisa a oxidação tanto de monofenóis (tirosina e fenol) e difenóis (catecol) como de trifenóis (pirogalol). Atualmente, vários procedimentos para determinação de fenóis usando métodos enzimáticos vêm sendo empregados e um deles é a construção de biossensores utilizando a enzima PFO (Lima *et al.*, 2001, Vieira *et al.*,

2003, Perone *et al.*, 2009).

Este trabalho teve como objetivo principal extrair a enzima PFO com alta atividade e estudar a intercalação do CaP com o TBA⁺OH⁻.

Material e Métodos

O inhame (*alocassia macrorrhiza*) utilizado para preparar o extrato bruto foi proveniente da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte.

Para preparar o extrato bruto de PFO, 100g de inhame foi homogeneizado em liquidificador com 200mL de tampão fosfato 0,1M, pH entre 6 e 8, contendo 10g de ácido ascórbico. Utilizou-se ácido ascórbico para diminuir a oxidação da enzima PFO durante o processo. A seguir, o material foi filtrado e centrifugado a 600rpm, durante 60min. As soluções sobrenadantes foram armazenadas em refrigerador e poderão ser utilizadas como fonte enzimática na construção de membranas para biossensor (Lima *et al.*, 2001, Vieira *et al.*, 2003). Todos os reagentes foram de grau analítico.

A atividade enzimática foi determinada pela medida de absorvância em $\lambda = 450\text{nm}$, da melanina resultante da polimerização da quinona, formada após reação entre 0,2mL da solução sobrenadante e 2,8mL de solução 0,05M de pirogalol em tampão fosfato 0,1M (pH entre 6 e 8), à temperatura de 25°C. A atividade enzimática (A_t , U/mL) foi calculada a partir da curva de absorvância versus o tempo de reação usando a equação 1:

$$A_t = \frac{1000 \Delta_{\text{abs}}}{V \times \Delta_t} \quad (1)$$

Onde V é o volume da solução resultante (enzima mais pirogalol) 3,0; Δ_t é a variação do tempo da reação enzimática e Δ_{abs} é a variação da absorvância da solução da reação observada. Uma unidade de polifenoloxidase (U) é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 na absorvância por minuto dentro das condições descritas (Cestari *et al.*, 2002). As medidas da atividade da enzima foram conduzidas usando um espectrofotômetro UV modelo mini 1240 da marca SHIMADZU.

O processo utilizado para purificação da enzima foi o da diálise. Neste processo, a solução sobrenadante contendo a PFO foi

colocada dentro de um saco de material semipermeável, como o celofane (acetato de celulose). Quando o saco de diálise é imerso em tampão, as moléculas protéicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise.

O CaP foi sintetizado adicionando-se lentamente uma solução diluída de cloreto de cálcio dihidratado a uma solução de fosfato de amônio dibásico seguido de aquecimento a 90°C. A suspensão formada permaneceu reagindo durante 1h e, em seguida, o precipitado formado foi filtrado e aquecido acima de 150°C por 12h a fim de se obter o CaP livre de amônia.

Uma reação de esfoliação consiste na separação das lamelas do composto através de um reagente químico. Uma suspensão coloidal foi preparada por titulação lenta do fosfato de cálcio com uma solução 0,5M de TBA⁺OH⁻, em água, para um pH constante igual a 8,0. A completa esfoliação ocorreu após vários dias com excesso de solução de TBA⁺OH⁻.

As análises termogravimétricas das amostras de CaP e CaP intercalado com TBA⁺OH⁻ foram conduzidas em uma termobalança TGA-50 SHIMADZU, com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ e em fluxo de ar de 50ml min⁻¹.

Resultados e Discussão

A atividade enzimática calculada a partir da curva de absorvância versus o tempo de reação foi de aproximadamente 860U/mL. Esse valor sugere que a enzima extraída do inhame tem afinidade para com o substrato (pirogalol) utilizado neste trabalho. Alguns valores encontrados na literatura para outros vegetais, tais como, abobrinha, pêssego, mandioca, respectivamente 262, 360, 1568U/mL, também indicam essa particularidade.

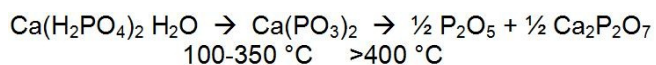
Os valores do pH versus a atividade são apresentados na [Figura 1](#). Apenas um máximo no pH 7,0 foi observado. Em geral a PFO mostra atividade próxima a este valor.

O CaP é um sólido lamelar que se comporta como um ácido, podendo ser ativado através da reação com uma base como o TBA⁺OH⁻ (Malloouk *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 1997). O mecanismo é iniciado quando os cátions TBA⁺ são forçados a intercalar através da reação de neutralização do ácido fraco matriz, com a base forte. O átomo de oxigênio ligado ao hidrogênio

do ligante $O_2P(OH)_2^-$ é destacado do átomo de cálcio, devido à hidrólise provocada pela entrada dos grupos OH^- do hidróxido, deixando deste modo as lamelas com cargas negativas. Neste processo, o sólido deve ter uma composição aproximada $Ca(H_2PO_4)[(TBA^+)_2PO_4] \cdot H_2O$, sendo disperso em água. A completa esfoliação observa-se após alguns dias com a permanência de uma suspensão coloidal esbranquiçada.

Dentro do espaço lamelar, devido à presença dos cátions, ocorrerá uma maior separação das lamelas, provocada, portanto, pelas repulsões eletrostáticas cátion-cátion. Este colóide é unilamelar e contém, em ambos os lados da lamela, os cátions TBA^+ . A intercalação é feita para separar as camadas do CaP e torná-lo apto a receber a enzima.

A [Figura 2](#) apresenta as curvas termogravimétricas das amostras de CaP e CaP intercalado com TBA^+OH^- . Na Figura 2(a) observa-se uma perda de massa no intervalo de 100 a 350°C relativa à saída das moléculas de água e uma perda de massa devido à saída de P_2O_5 e $Ca_2P_2O_7$ acima de 400°C. Baseando-se nestes dados, pode-se propor o seguinte mecanismo para o processo de decomposição:



A curva termogravimétrica do CaP intercalado com TBA^+OH^- , Figura 2(b), apresenta perda de massa no intervalo de 350 à 400°C, indicando saída do composto tetrabutilamônio e acima de 400°C inicia-se a formação do pirofosfato de cálcio, $Ca_2P_2O_7$.

A incorporação da enzima no CaP intercalado com TBA^+OH^- será investigada em trabalhos futuros.

Conclusões

Os resultados deste trabalho indicam que a enzima PFO extraída do inhame está presente na solução sobrenadante, pois o comprimento de onda da quinona, referente à absorvância máxima, apresenta uma atividade aproximadamente a 860U/mL em solução tampão 0,1M, pH 7. Observou-se a formação de uma solução coloidal esbranquiçada após intercalação do TBA^+OH^- no CaP. A intercalação

do CaP com TBA^+OH^- foi efetivada e este material é apto a receber a enzima PFO a fim de se obter uma membrana enzimática para ser utilizada como eletrodo em biossensores de poluição.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPQ pelo suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Referências

1. CESTARI, A. R., VIEIRA, E. F. S., NASCIMENTO, A. J. P., FILHA, M. M. S., AIROLDI, C., **Factorial Design Evaluation of Some Experimental Factors for Phenols Oxidation using Crude Extracts from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*)**. Journal of the Brazilian Chemical Society 13:2 (2002) 260-265;
2. DURFORD, H. B., **Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetics Properties**. In Peroxidases in chemistry and Biology vol. 2 (1991) 1-24 (eds Everse, J., Everse, K. E., Grishan, M. B. Publisher: CRC, Boca Raton, Fla. CODEN:57BIA7. English);
3. FENDLER, J. H., **Self-assembled nanostructured materials**, Chemistry Materials 8:8 (1996) 1616-1624.
4. FREIRE, R. S., PELEGRINI, R., KUBOTA, L. T., DURÁN, N., PERALTA-ZAMORA, P., **Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas**, Química Nova 23 (2000) 504-511;
5. KIM, H-N., KELLER, S. W., MALLOUK, T. E., SCHMITT, J., DECHER, G., **Characterization of zirconium phosphate/polycation thin films grown by sequential adsorption reactions**, Chemistry of Materials 9:6 (1997) 1414-1421;
6. LIMA, C. B. A., AIROLDI, C., **Topotactic exchange and intercalation of calcium phosphate**, Solid State Sciences 6 (2004) 1245-1250;
7. LIMA, C. B. A., AIROLDI, C., **Solid State Sciences Layered crystalline calcium phenylphosphonate-synthesis, characterization and n-alkylmonoamine intercalation**, 4 (2002)

- 1321-1329.
8. LIMA, E. D. P. A., PASTORE, G. M., LIMA, C. A. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa L.*) madura**, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21:1 (2001) 98-104;
 9. MACHOLAN, L. **Biocatalytic Membrane Eletrodes**. In: "Bioinstrumentation and Biossensores". Ed. by D. L. Wise, Marcel Dekker, N. Y. (1990) cap 12;
 10. MALLOOUK, T. E., GAVIN, J. A., **Molecular recognition in lamellar solids and thin films**, *Accounts Chemical Research* 31:5 (1998) 209-217.
 11. PERONE, C. A. S., CAPOBIANCO, M. P., JUNIOR, S. P., **Determinação de polifenóis (taninos) em produtos alimentícios (chás) usando biossensor de (*Polifenol oxidase*), obtida de extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*) e caracterização desse biossensor**, *Revista do Instituto de Ciências da Saúde* 27 (2009) 28-34.
 12. 11th Report on Carcinogens, Eleventh Edition on January 31(2005), 1-4.
 13. ROSSATO, S. S., FREIRE, R. S., DURÁN, N., KUBOTA, I. T., **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**, *Química Nova* 24 (2001) 77-86.
 14. SIGNORI, C. A., FILHO, O. F., **Biossensor amperométrico para determinação de fenóis usando um extrato bruto de Inhame (*Alocasia macrorrhiza*)**, *Química Nova* 17:1 (1994) 38-42;
 15. VIEIRA, I. C., LUPETTI, K. O., FATIBELLO-FILHO, O., **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*)** *Química Nova* 26:1 (2003) 39-43;

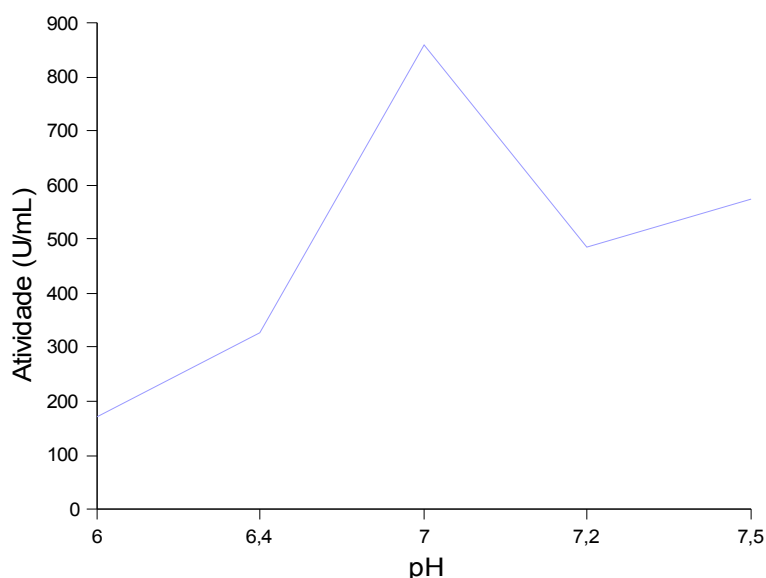


Figura 1 – Efeito do pH na atividade específica de PFO em extrato de inhame. Substrato: Piragalol 0,05M.

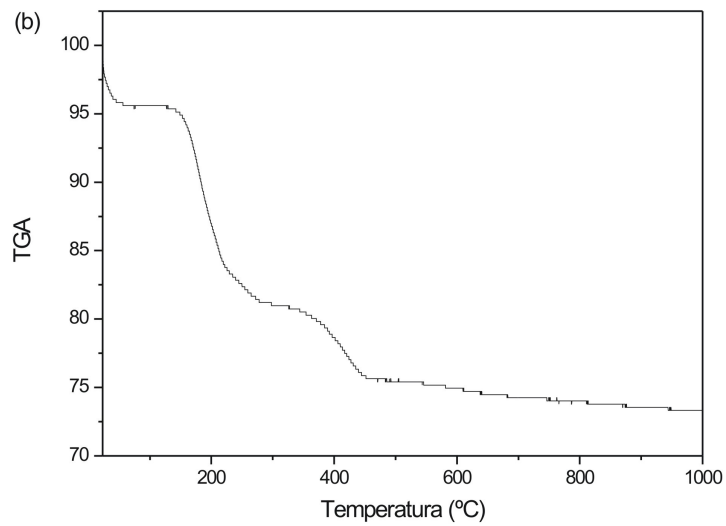
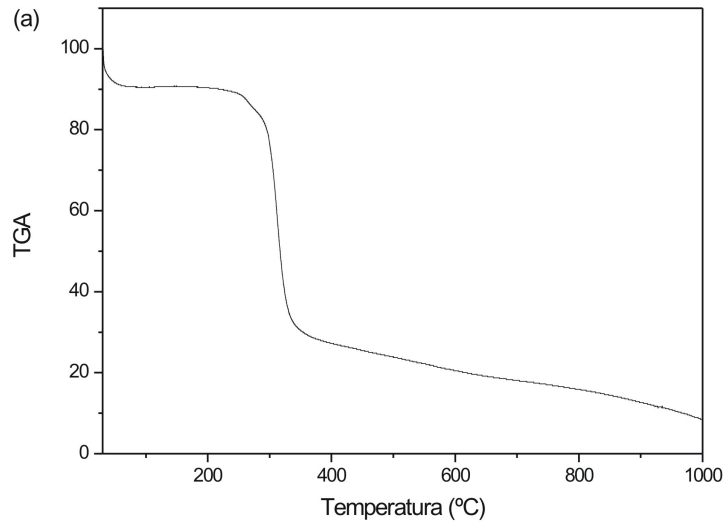


Figura 2 – Curvas termogravimétricas do (a) fosfato de cálcio e do (b) fosfato de cálcio intercalado com hidróxido de tetrabutílamônio.