

INFLUÊNCIA DO PH DE LAVAGEM E DE ELUIÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO EXPANDIDO

**REGINATTO, Lais; MALTA, Danielle Specht; GAUTÉRIO, Gabrielle Victoria;
BUFFON, Jaqueline Garda
KALIL, Susana Juliano**

*laais.reginatto@gmail.com

Evento: Congresso de Iniciação Científica
Área do conhecimento: Ciências Agrárias

Palavras-chave: farelo de arroz, Streamline™ SP, oxidorreductases.

1 INTRODUÇÃO

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de diversos substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora (MATHÉ et al., 2010). Essas enzimas são aplicáveis em diversas áreas como biomédica, clínica, biotecnológica e industrial. Dependendo para o fim que se destina, é necessário que as peroxidases sejam submetidas à purificação, a qual pode ser alcançada pelo uso da cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido (ALE). O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do pH nas etapas de lavagem e eluição na purificação de peroxidase por ALE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cromatografia de troca iônica consiste na competição dos íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005). Quando operada em modo expandido, essa técnica é capaz de proporcionar a purificação de biocompostos através de um único processo, aumento da produtividade, maior interação adsorvente-molécula alvo e possibilidade de aumento de escala (GAUTÉRIO et al. 2015; TOLEDO et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato clarificado de peroxidase foi obtido segundo Feltrin (2013) utilizando meio de extração contendo farelo de arroz integral e solução tampão fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10. A purificação da peroxidase por ALE foi realizada conforme Gautério et al. (2015). A coluna contendo 10 cm de leito de resina Streamline™ SP foi equilibrada com solução tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 de modo a obter um leito estável no grau de expansão de 2,5. Em seguida, foi feita a alimentação em fluxo ascendente do extrato clarificado de peroxidase diluído 1:1 e ajustado no pH 4,5.

A lavagem foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio da resina, porém nos valores de pH de 5,0 (ensaio 1) ou 5,5 (ensaio 2). Esta etapa se procedeu até que a absorvância a 280 nm fosse menor que 0,05 e permanecesse constante. Na eluição, o adaptador foi movido até a posição 10 cm e esta foi feita em modo fixo e em fluxo descendente. A eluição foi realizada em gradiente linear salino de 0 a 1 mol/L de NaCl em solução tampão nos valores de pH de 5,0 (ensaio 1) ou 5,5 (ensaio 2), e velocidade de 100 cm/h. Em todo processo de purificação, frações foram coletadas na saída da coluna e submetidas à verificação da atividade

enzimática, quantificação de proteína, leitura da absorvância a 280 nm e pH. A eficiência do processo foi determinada pelo cálculo do fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC), conforme as equações 1 e 2, respectivamente.

$$FP = \frac{A_e EP}{A_e EI} \quad (1) \quad REC(\%) = \frac{A_t EP}{A_t EI} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde $A_e EP$ é a atividade específica (U/mg) do extrato enzimático purificado; $A_e EI$ é a atividade específica do extrato enzimático clarificado inicial; $A_t EP$ é a atividade total (U) do extrato enzimático purificado; e $A_t EI$ é a atividade total do extrato enzimático clarificado inicial. A atividade enzimática foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. Uma unidade da atividade de peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol ($\epsilon = 26600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) em 1 min. As proteínas foram determinadas segundo Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores de FP e REC obtidos nos ensaios de purificação em diferentes valores de pH nas etapas de lavagem e eluição.

Tabela 1 – Valores de FP e REC obtidos nos ensaios de purificação.

Ensaio	pH na lavagem e eluição	FP (vezes)	REC (%)
1	5,0	3,4	46,7
2	5,5	4,8	50,6

O uso do pH 5,5 na lavagem proporcionou ambiente favorável para posterior recuperação da enzima, evitando a diminuição brusca do pH durante a eluição da mesma e refletindo em maiores valores de FP e REC. Os intervalos de pH durante a eluição se mantiveram entre 4,57 a 4,86 e 5,12 a 5,43 nos ensaios 1 e 2, respectivamente, indicando que condições menos ácidas contribuem para maiores valores de FP e REC. Gautério et al. (2015) utilizaram pH de 4,7 na eluição, e obtiveram FP de 2,4 vezes e REC de 41%. Em ambos os ensaios mostrados no presente trabalho, foi possível obter maior FP e REC através do mesmo processo de purificação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do pH 5,5 nas etapas de lavagem e eluição se mostrou o mais favorável para purificação de peroxidases, sendo possível obter FP de 4,81 vezes e REC de 50,6%. **Agradecimentos:** Capes, Cnpq e PDE/EPEM – FURG.

REFERÊNCIAS

- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 153-164, 2015.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.
- TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.