

Imobilização de α -Quimiotripsina na Sílica Mesoporosa MCM-41.

Fernanda F. Camilo (PQ) e Marcos A. Bizeto* (PQ)

Laboratório de Materiais Híbridos, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo

Email: mabizeto@unifesp.br

Palavras Chave: Sílica mesoporosa, imobilização de enzimas, biocatalisador, MCM-41, quimiotripsina.

Introdução

Enzimas são catalisadores naturais que apresentam grande eficiência e especificidade. Entretanto o uso rotineiro desses biocatalisadores em transformações químicas é severamente limitado pelo alto custo e pela pouca estabilidade das enzimas fora do meio biológico. A imobilização de enzimas em matrizes inorgânicas porosas nanoestruturadas é uma alternativa que vem sendo avaliada para suplantar as limitações destacadas anteriormente¹. Enzimas imobilizadas em matrizes sólidas podem ser facilmente recuperadas, diminuindo o custo efetivo do processo. A imobilização pode, também, promover a estabilização da enzima e possibilitar o uso em solventes orgânicos. A matriz usada como suporte, por sua vez, deve evitar a agregação e a desnaturação espontânea da enzima, não interferir nas propriedades e permitir o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Neste estudo, a enzima α -quimiotripsina comercial (Aldrich), extraída de pâncreas bovino, foi imobilizada na sílica mesoporosa MCM-41, não modificada e pós-funcionalizada com grupos $-\text{SO}_3\text{H}$, a fim de averiguar o efeito da funcionalização da sílica na interação com a enzima.

A quimiotripsina é uma enzima digestiva proteolítica, que provoca a quebra de ligações peptídicas que contenham aminoácidos como tirosina, fenilalanina e triptofano. Esse tipo de biocatalisador tem aplicações na indústria alimentícia e de produção de intermediários farmacêuticos.

Resultados e Discussão

A MCM-41 foi sintetizada a partir de uma mistura de tetraetortossilicato (TEOS), NaOH, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e água nas seguintes proporções molares $615 \text{ H}_2\text{O} : 0,32 \text{ NaOH} : 0,125 \text{ CTAB} : 1 \text{ TEOS}$. O sólido formado foi calcinado a 550°C para eliminação da matéria orgânica e formação da estrutura porosa². A MCM-41 foi obtida com grande ordenamento estrutural, evidenciado pela difratometria de raios X. O tamanho dos poros estimado por microscopia eletrônica de transmissão é de aproximadamente 30 \AA .

A pós-funcionalização foi realizada pela reação da MCM-41 com mercaptopropiltrimetoxi silano em tolueno, e depois pela oxidação do grupo $-\text{SH}$ a ácido sulfônico usando H_2O_2 em meio ácido. A funcionalização foi confirmada por análise

termogravimétrica (TGA) e por espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR). Foram gerados cerca de $0,82 \text{ mmol.g}^{-1}$ de grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ na sílica.

A imobilização da α -quimiotripsina foi feita por adsorção física em solução aquosa tamponada (pH 7,2 – tampão fosfato) nas duas sílicas citadas e a quantidade de material adsorvido foi avaliada por termogravimetria.

A inserção e a avaliação do estado da enzima com a matriz inorgânica foi feita por espectroscopia vibracional no infravermelho. Duas bandas sensíveis aos processos de alterações conformacionais e desnaturação da enzima foram avaliadas. Uma banda na região de $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, chamada de Amida I, atribuída ao estiramento de grupos carbonílicos e uma na região de $1530 - 1560 \text{ cm}^{-1}$, chamada de Amida II, atribuída a deformação angular do grupo $-\text{NH}$. Nos espectros de FTIR registrados não há diferenças significativas entre essas bandas na enzima livre e imobilizadas, o que indica a retenção da estrutura secundária da proteína no processo de imobilização. Na MCM-41 funcionalizada com $-\text{SO}_3\text{H}$ as bandas da enzima aparecem com intensidade maior que na MCM-41 não funcionalizada, o que indica que a modificação superficial pode proporcionar uma melhor interação enzima-suporte, estabilizando a proteína e preservando seu arranjo estrutural. Tais resultados mostraram que apesar da enzima ter dimensão ligeiramente maior do que os poros da MCM-41, a mesma teve seu tamanho ajustado a cavidade, o que promoveu a manutenção da atividade da protease frente à hidrólise da azocaseína.

Conclusões

A enzima α -quimiotripsina foi imobilizada, sem degradação, nos poros da sílica MCM-41, não modificada e funcionalizada com grupos $-\text{SO}_3\text{H}$, conservando sua atividade.

Agradecimentos

CNPq (processo 478954/2008 5) e Profa. Vera R. L. Constantino, Laboratório de Sólidos Lamelares, IQ-USP e ao CESQ-POLI-USP.

¹ Wang, P., *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, 17,574.

² Cai Q., Lin W. Y., Xiao F.S., Pang W.Q., Chen X. H., Zou B. S. *Microporous Mesoporous Mater.* **1999**, 32, 1.