

**Imobilização de Enzima Peroxidase sobre
Goma de Cajueiro Eletrodepositada em
Superfície de Platina para Detecção de
Peróxido de Hidrogênio**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 111

**Imobilização de Enzima Peroxidase
sobre Goma de Cajueiro
Eletrodepositada em Superfície de
Platina para Detecção de Peróxido de
Hidrogênio**

*Emanuela Iana de Paiva Lima Chaves
Gabrielle Albuquerque Freire
Carlucio Roberto Alves
Roselayne Ferro Furtado*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2016

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Marcos Antônio Nakayama*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cássia Costa Cid*

Fotos da capa: *Roselayne Ferro Furtado; prato com goma de cajueiro e, em detalhe, superfície de platina*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

On-line (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Imobilização de enzima peroxidase sobre goma de cajueiro eletrodepositada em superfície de platina para detecção de peróxido de hidrogênio / Emanuela Lana de Paiva Lima Chaves... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

17 p. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 111).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Polissacarídeo. 2. Biomolécula. 3. Biossensor. 4. Eletrodeposição. 5. Filme. 6. Contaminante. I. Chaves, E. I. de P. L. II. Freire, G. A. III. Alves, C. R. IV. Furtado, R. F. V. Série.

CDD 547.782

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	7
Resultados e Discussão.....	9
Conclusão	15
Referências	16

Imobilização de Enzima Peroxidase sobre Goma de Cajueiro Eletrodepositada em Superfície de Platina para Detecção de Peróxido de Hidrogênio

Emanuela Iana de Paiva Lima Chaves¹

Gabrielle Albuquerque Freire²

Carlucio Roberto Alves³

Roselayne Ferro Furtado⁴

Resumo

Goma de cajueiro é um exsudato encontrado em áreas produtoras de caju. Esse polissacarídeo pode ser usado como plataforma de imobilização de biomoléculas, agregando valor à cajucultura. Este trabalho teve o objetivo de eletrodepositar goma de cajueiro sobre superfície de platina para então imobilizar a peroxidase sobre esse filme visando à detecção de peróxido de hidrogênio. Inicialmente, uma metodologia para eletrodeposição do polissacarídeo foi desenvolvida utilizando técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Enzima peroxidase foi imobilizada por adsorção química sobre o filme formado para detecção de peróxido de hidrogênio. As etapas de montagem e de desempenho do biossensor enzimático foram caracterizadas por voltametria cíclica e cronoamperometria. O biossensor foi satisfatoriamente desenvolvido em superfície de platina e apresentou alta sensibilidade, sendo capaz de detectar concentrações inferiores ao limite estabelecido pela Anvisa. Esses resultados corroboram as perspectivas de uso da goma de cajueiro como plataforma de imobilização de biomoléculas de interesse comercial.

Termos para indexação: polissacarídeo, biomolécula, biossensor, eletrodeposição, filme, contaminante.

¹ Graduanda em química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, emanuela.iana@gmail.com

² Graduanda em química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, gabi.a.freire@hotmail.com

³ Químico, doutor em Físico-química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, alvescr@yahoo.com

⁴ Bióloga, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, roselayne.furtado@embrapa.br

Immobilization of Peroxidase on Electrodeposited Cashew Gum for Hydrogen Peroxide Detection

Abstract

Cashew gum is an exudate found in productive areas of cashew. This polymer can be used as a platform for biomolecules immobilization and to add value to cashew agribusiness productive chain. This work aimed to electrodeposit cashew gum on the platinum surface for immobilizing peroxidase on this film in order to detect hydrogen peroxide. At firstly, a method for polysaccharide electrodeposition was developed using electrochemical technique of cyclic voltammetry. Peroxidase was immobilized by chemical adsorption on the film formed for hydrogen peroxide detection. The assembly steps and performance of the enzymatic biosensor was characterized by chronoamperometry and cyclic voltammetry techniques. The biosensor was satisfactorially developed in platinum surface and showed a detection limit below of the method recommended by Anvisa for hydrogen peroxide detection. The results obtained confirm the perspectives for using cashew gum as platform of biomolecules immobilization of commercial interest.

Index terms: polysaccharide, biomolecule, biosensor, electrodeposition, film, contaminant.

Introdução

Gomas naturais têm uma grande variedade de composição química que reflete em propriedades físico-químicas interessantes sob o ponto de vista de aplicações industriais. A síntese de novas moléculas com características semelhantes às gomas naturais não é uma tarefa muito fácil de ser realizada, mas o baixo custo, a biocompatibilidade, a disponibilidade local e a biodegradabilidade justificam os estudos com esses biopolímeros e despertam o interesse para tecnologias futuras.

A produção de exsudato no cajueiro (*Anacardium occidentale*) ocorre em resposta a injúrias e ataques de patógeno, sendo um mecanismo de defesa da planta. Esse processo pode ser estimulado por cortes no tronco da planta e também por meio do uso de estimulantes comerciais como o Ethrel. A goma de cajueiro é composta predominantemente de um complexo de heteropolissacarídeos, mas também são encontrados outros elementos como sais, proteínas e fenóis. Também compõem a goma: monossacarídeos galactose (61%-72%), glicose (8%-14%), arabinose (4,6%-14%), ramnose (3,2%-7%) e ácido glicurônico (4,7%-5%), sendo a quantidade de cada composto químico relacionada à origem, idade da planta, tempo de exsudação e condições climáticas (PAULA; RODRIGUES, 1995; ARAÚJO et al., 2012).

Polissacarídeo obtido de cajueiro pode ser uma excelente plataforma de ligação/retenção de biomoléculas, as quais, por sua vez, podem ser imobilizadas por ligação iônica, covalente ou enclausuramento. A goma é considerada um polieletrólito aniônico, principalmente devido à presença do ácido glucurônico que confere cargas na cadeia do polissacarídeo e propicia a ligação de biomoléculas. Outros monossacarídeos, tais como a galactose e glicose, no mesmo sentido, favorecem o uso da goma como adsorbato e também como suporte para a adsorção de moléculas. A modificação da goma de cajueiro para a introdução de grupos funcionais é também uma alternativa a ser adotada no intuito de favorecer a ligação de grupos reativos com as moléculas de origem biológica (SILVA et al., 2004).

Peroxidasas são enzimas estáveis e possuem um grande potencial de uso em biossensores para detecção de peróxido de hidrogênio em leite. A adição de peróxido de hidrogênio em leite não é uma prática permitida pela Legislação brasileira, mas é realizada por alguns produtores mal intencionados para disfarçar más condições higiênico-sanitárias.

De forma generalizada, no desenvolvimento de biossensores, a etapa de imobilização de biomoléculas é crucial para o desempenho do método. O uso da goma de cajueiro como suporte de imobilização pode ser vantajoso, visto que, de acordo com estudos, polissacarídeos naturais contribuem para a estabilidade de moléculas biológicas (MACIEL et al., 2007; VALENGA et al., 2012). Esse fato é de suma importância, pois, geralmente, moléculas biológicas estão sujeitas a perderem a atividade quando imobilizadas.

Estudos de eletrodeposição de goma de cajueiro para imobilização de enzimas não foram ainda explorados na literatura, apesar de alguns trabalhos indicarem a potencialidade da goma de cajueiro na imobilização de diferentes proteínas (MONTEIRO et al., 2007). A eletrodeposição desse biopolímero é interessante para a formação de um filme homogêneo e fortemente aderido a uma superfície mediante a polarização da superfície eletródica.

Sendo assim, este estudo foi desenvolvido objetivando a eletrodeposição da goma de cajueiro em meio aquoso, seguido da imobilização da enzima peroxidase, no intuito de desenvolver um biossensor para detecção de peróxido de hidrogênio para uma futura aplicação em alimentos.

Material e Métodos

A goma de cajueiro (GC) bruta, oriunda do Campo Experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical, foi submetida aos procedimentos de precipitação etanólica de acordo com metodologia descrita por Torquato et al. (2004), à qual foi adicionada uma etapa de centrifugação, para auxiliar na eliminação das impurezas e tornar mais fácil a filtragem do

polissacarídeo. Para isso, a GC foi triturada, dissolvida em água (30% g/L), centrifugada por 10 minutos com rotação a 10.000 rpm a 25 °C, filtrada e precipitada com etanol comercial (96 °GL) à razão etanol:goma 3:1 (m/m). O precipitado foi isolado e colocado para secar em estufa com circulação de ar a 60 °C por 24 horas. Ao final, a GC foi triturada em moinho analítico de impacto.

Para os experimentos de eletrodeposição, a goma foi dissolvida em solução de Na₂SO₄ 0,5 M em diferentes concentrações (1%, 3%, 5% e 8% – m/v) por meio da homogeneização em ultra-turrax (10.000 rpm, por 5 minutos). Em seguida, 10 mL da solução foi colocada em uma célula eletroquímica com três eletrodos: trabalho de platina (com área de 0,015 cm²), auxiliar helicoidal de platina e referência Ag/AgCl, para as medidas eletroquímicas em um potenciostato/galvanostato μAutolabIII/FRA2. A eletrodeposição do polissacarídeo foi realizada por voltametria cíclica em janela de potencial de -0,9 V a 0,5 V e velocidade de varredura de 50 mV/s. A caracterização eletroquímica dos filmes eletrodepositados foi realizada por técnica potenciodinâmica em solução de K₃[Fe(CN)₆] 50 mM e KCl 0,1 M.

Após a eletrodeposição dos filmes, eles foram colocados em contato com solução de peroxidase de raiz forte tipo VI da Sigma-Aldrich (0,5 mg mL⁻¹) preparada em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 6,5 por 15 minutos. Ao final, foram feitas lavagens com água deionizada e a realização das medidas do biossensor por cronoamperometria. As análises foram realizadas em solução de H₂O₂ e hidroquinona de 600 μMolar e 35 μMolar, respectivamente, aplicando o potencial de -0,115 V por 120 segundos. O biossensor foi também caracterizado por técnica de voltametria cíclica em solução de K₃[Fe(CN)₆] 50 mM e KCl 0,1 M.

Para a otimização da resposta do biossensor, um delineamento de composto central rotacional foi adotado em 11 ensaios e 3 pontos centrais, variando os tempos de adsorção da enzima e o número de ciclos de varredura para otimizar a resposta do biossensor conforme a Tabela 1. As condições utilizadas para a resposta do biossensor foram aquelas descritas acima para as medidas por cronoamperometria.

Tabela 1. Detalhamento do delineamento de composto central rotacional.

Parâmetros	Níveis de variáveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo de adsorção (minutos)	5	7,91	15	22,09	25
Números de ciclos de varredura	2	2,72	4,5	6,27	7

Resultados e Discussão

A formação de filmes de polissacarídeos obtidos a partir da GC sobre diferentes superfícies tem sido estudada, principalmente, por adsorção química, visando à imobilização de biomoléculas (MACIEL et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007). De modo diferente, mas com o mesmo propósito, o presente estudo formou filme de goma de cajueiro sobre superfície de platina por eletrodeposição. Inicialmente, foi selecionada a janela de potencial de trabalho para a eletrodeposição da GC, que corresponde a potenciais entre os processos de evoluções de hidrogênio (cerca de -1,0 V) e de oxigênio (cerca 1,3 V), sendo observadas a adsorção eletroquímica do polissacarídeo da superfície eletródica e a não ocorrência de processos eletroquímicos para o polieletrólito.

A modificação superficial, decorrente do recobrimento, foi evidenciada pela crescente corrente para o pico anódico por volta de -0,4 V com o aumento da concentração da GC em solução (Figura 1A). Verificou-se que a modificação superficial interrompe o processo redutivo para o eletrólito Na_2SO_4 0,5 M, em concentrações superiores a 3% de GC.

Após os respectivos processos de recobrimento, o eletrodo modificado foi colocado em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM e KCl 0,1 M. Essa solução eletrolítica é bastante conhecida pelas reações de transferência eletrônica, sendo utilizada para testar a barreira cinética da transferência de carga entre a solução e a interface do eletrodo.

Na Figura 1B, observa-se a diminuição na área eletroativa do eletrodo a partir da diminuição de correntes para os processos redox com o aumento de concentrações de GC, corroborando a modificação na superfície.

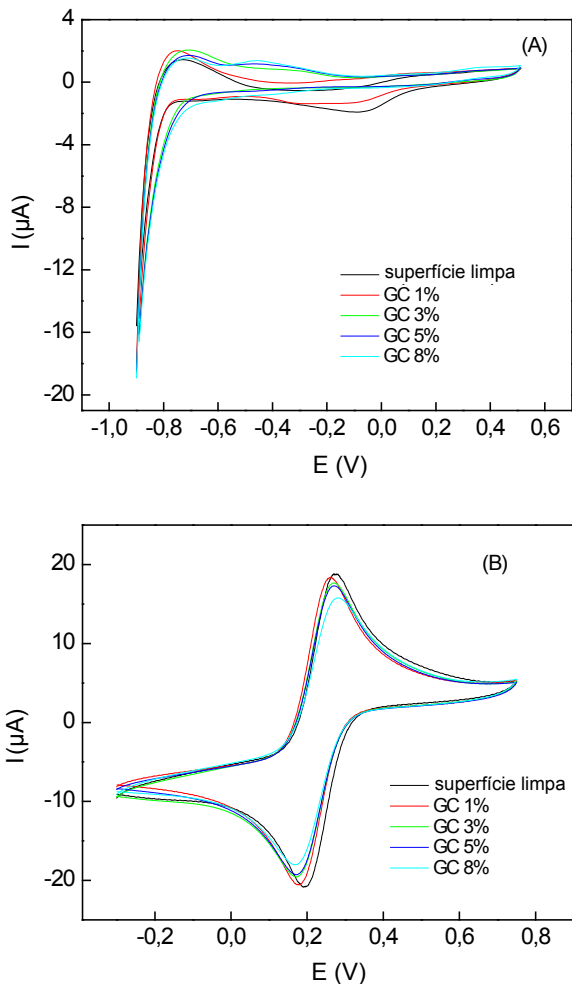


Figura 1. Voltamogramas cíclicos para superfície de platina com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (A) Curvas referentes à eletrodeposição de GC (1%, 3%, 5% e 8%) em solução de Na_2SO_4 0,5 M. (B) Curvas para superfície de platina modificada, após os diferentes processos de eletrodeposições de goma de cajueiro, em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM e KCl 0,1 M.

Foi verificado um aumento gradativo no recobrimento da superfície com o aumento da concentração do polissacarídeo em solução que pôde ser estimado pela seguinte fórmula: $\Gamma = 1 - \text{IEM} / \text{IEL} \times 100$, em que IEM representa a corrente do pico anódico do eletrodo modificado, e IEL, a corrente do pico anódico do eletrodo. A Tabela 2 indica os resultados obtidos para cada concentração de GC na modificação da superfície.

Tabela 2. Estimativa do percentual de recobrimento de superfície de platina (Γ) por diferentes concentrações de GC.

Concentração da GC (m/V)	1%	3%	5%	8%
Γ (%)	1,8	4,6	8,6	12,6

A partir da eletrodeposição da goma de cajueiro, peroxidase (HRP) foi imobilizada na superfície do filme de goma de cajueiro por adsorção química. Visando à confirmação da deposição enzimática após o tempo de adsorção da enzima, uma varredura de potencial foi realizada em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM e KCl 0,1 M, conforme pode ser visto na Figura 2A. A atividade da enzima imobilizada foi avaliada em solução de H_2O_2 600 μM e hidroquinona 4 mM. Um pico catódico bem definido e de maior corrente elétrica foi verificado na presença da enzima (Figura 2B). O pico está relacionado à redução do mediador químico (hidroquinona) que acontece em baixo potencial de trabalho. Contudo, na presença da enzima, a redução de íons é aumentada, porque, durante o ciclo biocatalítico da enzima, ocorre a oxidação do grupo prostético heme da peroxidase pelo peróxido de hidrogênio, e a forma oxidada da enzima é, então, reduzida à sua forma nativa, principalmente, por elétrons recebidos do mediador. A enzima é regenerada, e o mediador oxidado é reduzido por elétrons provenientes do eletrodo, resultando no pico catódico encontrado na Figura 2B.

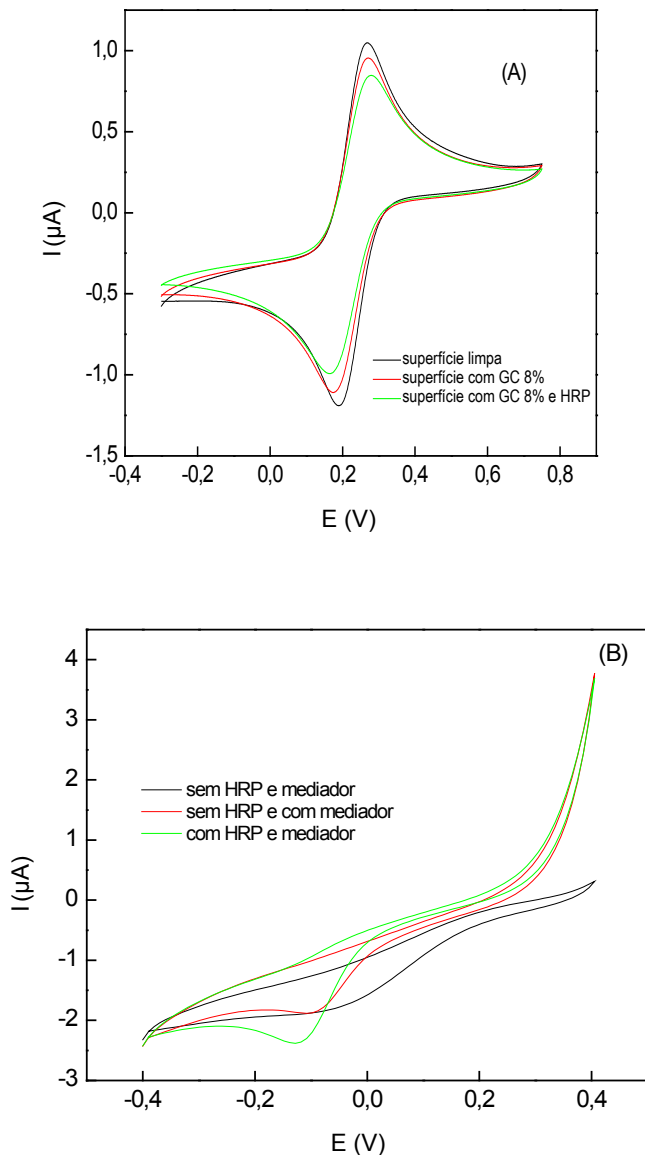


Figura 2. Voltamograma cíclico para superfície de platina com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (A) Curvas obtidas em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 mM e KCl 0,1 M de cada etapa da montagem do biossensor. (B) Curvas obtidas em tampão fosfato salino 10 mM pH 6,5, na presença e ausência de HRP 600 μM e hidroquinona 4 mM.

Um estudo de delineamento de composto central foi realizado no intuito de avaliar as melhores condições de resposta do biossensor baseado na quantidade de varreduras para a eletrodeposição da GC em solução e tempo de adsorção da enzima no filme de polissacarídeo. Verificou-se que melhores respostas foram encontradas para valores próximos a sete ciclos de varredura para formação do filme e 15 minutos para a adsorção da enzima (Figura 3). Esses parâmetros foram utilizados para a construção da curva de calibração do biossensor. Os resultados da análise de variância (ANOVA) referentes aos dados analisados estão indicados na Tabela 3. Não foi possível estabelecer um modelo preditivo a partir dos dois parâmetros avaliados, considerando que o teste F não indicou significância a nível de 5%.

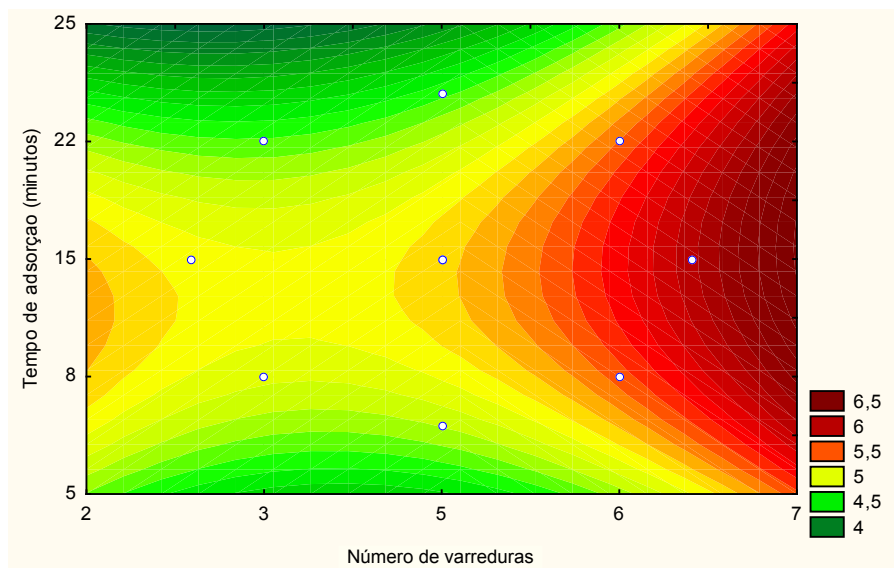


Figura 3. Gráfico de contorno referente à resposta analítica do biossensor obtida em diferentes concentrações de H_2O_2 por amperometria, utilizando potencial de $-0,115$ V por 120 segundos, em função do número de varreduras e tempo de adsorção da enzima sobre o filme de GC.

Tabela 3. ANOVA da resposta analítica do biossensor obtida em diferentes concentrações de H_2O_2 por cronoamperometria, utilizando potencial de -0,115 V por 120 segundos, em função do número de varreduras e tempo de adsorção da enzima sobre o filme de goma de cajueiro.

Fator	Soma dos quadrados	GL ⁽³⁾	F _{calculado}	p
Ciclo de varredura (L) ⁽¹⁾	0,85	1	2,40	0,18
Ciclo de varredura (Q) ⁽²⁾	0,17	1	0,48	0,52
Tempo de adsorção (L) ⁽¹⁾	0,06	1	0,17	0,69
Tempo de adsorção (Q) ⁽²⁾	0,32	1	0,91	0,38
Interação 1L x 2L	0,02	1	0,05	0,83
Resíduo	1,80	5	0,35	-
Total	3,41	10	-	-

⁽¹⁾(L) linear; ⁽²⁾(Q) quadrático; ⁽³⁾(GL) graus de liberdade.

Uma curva de calibração para esse biossensor foi construída a partir de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (Figura 4). Em tampão fosfato salino pH 6,5, a curva apresentou boa linearidade no intervalo de concentração com coeficiente de linearidade (R^2) = 0,95. O limite de detecção (LD) foi calculado pela equação $LD = DPB \times 3/IC$, em que LD representa o limite de detecção; DPB, o desvio padrão do branco, e IC, o coeficiente angular da reta. O limite de detecção foi de 3,04 μM . O resultado obtido foi considerado bastante satisfatório, haja vista que o limite de detecção do método de detecção de peróxido de hidrogênio recomendado pela Anvisa é de 300 ppm (8,82 mM) (ANVISA, 2010).

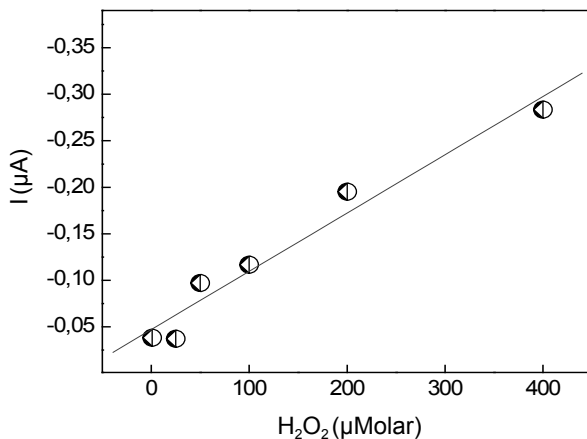


Figura 4. Curva analítica do biossensor baseado em filme de goma de cajueiro e HRP em solução PBS 10 mM pH 6,5, contendo diferentes concentrações de H_2O_2 .

Conclusão

É possível formar satisfatoriamente filme de goma de cajueiro sobre superfície de platina aplicando a técnica de voltametria cíclica. A modificação superficial com a goma de cajueiro funciona como uma plataforma para a enzima peroxidase, a qual permanece com atividade catalítica após imobilizada e é utilizada para a detecção de peróxido de hidrogênio.

Referências

- ANVISA. **Uma análise dos achados laboratoriais sobre ocorrências de fraudes em Leite UHT (UAT)**. Informe Técnico - nº 34 de 31 out. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/34_311007.htm>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- ARAUJO, I. M. S.; ZAMPA, M. F.; MOURA, J. B.; DOS SANTOS JUNIOR, J. R.; EATON, P.; ZUCOLOTTI, V.; VERAS, L. M. C.; de PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; LEITE, J. R. S. A.; EIRAS, C. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.
- MACIEL, J. da S.; KOSAKA, P. M.; PAULA, R. C. M.de.; FEITOSA, J. P. A.; PETRI, D. F. S. Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 522-529, 2007.
- MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, G. M. de M.; SILVA, J. B. R. da; PORTO, C. S.; CARVALHO JUNIOR, L. B. de; CARNEIRO-LEÃO, A. M. dos A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. das G.; PORTO, A. L. F. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 884-888, 2007.
- PAULA, R. C. M. de; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177-181, 1995.
- SILVA, D. A.; de PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; de BRITO, A. C. F.; MACIEL, J. .; PAULA, H. C. B. Carboxymetilation of cashew tree exudate polysaccharide, **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 163-171, 2004.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. E.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505-507, 2004.

VALENGA, F.; PETRI, D. F. S.; LUCYSZYN, N.; JO, T. A.; SIERAKOWSKI, M. R. Galactomannan thin films as supports for the immobilization of Concanavalin A and/or dengue viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 88-94, 2012.

Embrapa

Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA