



## IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM COMPÓSITOS DE POLI(ETILENO-TEREFTALATO)-POLI(ANILINA)-GLUTARALDEÍDO

### ENZYME IMMOBILIZATION IN POLY(ETHYLENE-TEREPHTHALATE)-POLY(ANILINE)-GLUTARALDEHYDE COMPOSITES

**SAMANTHA SALOMÃO CARAMORI**

**Endereço atual / Curret address:** Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74001-970; e-mail: samantha.salomao@ueg.br

**Dissertação de Mestrado / Master Dissertation:** Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74001-970/Posgraduate Program in Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, 74001-970.

**Defendida / Defended:** 03.II.2003

**Orientador / Supervisor:** Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP 74001-970/ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, 74001-970.

**RESUMO:** A imobilização de enzimas é uma técnica bastante utilizada quando se pretende obter dos sistemas catalisadores aumento de precisão e algumas características que permitam redução de custos, como estabilidade e possibilidade de reutilização do sistema. Neste trabalho foi desenvolvido um suporte capaz de imobilizar duas classes de enzimas, sintetizado a partir da hidrazinólise de placas de poli(etileno-tereftalato) (PET), seguida da síntese de poli(anilina) (PANI) sobre sua superfície. Esse material foi caracterizado por infravermelho de reflectância e fotomicrografia óptica e, em seguida, submetido a testes de imobilização com as enzimas *horseradish* peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) e tripsina (EC 3.4.21.4). Os resultados obtidos nos testes de imobilização foram comparados com os dados das enzimas na forma livre. A caracterização do suporte mostrou que a reação de hidrazinólise foi eficaz na exposição de grupos reativos na molécula de PET, além de ser um fator determinante da intensidade de cobertura de PANI. A imobilização de HRP mostrou ser um processo viável, com retenção de 40% da atividade enzimática, sob as seguintes condições: tempo de imobilização de 90 min, temperatura de 4°C, concentração de enzima de 0,01 mg mL<sup>-1</sup> e pH 4,5. Os parâmetros de reação mostraram algumas alterações em comparação com HRP livre. O pH ótimo de reação foi 7,0 e a enzima continuou a reconhecer seus substratos após o processo de imobilização, embora apresentasse reatividade diferente da mostrada pela enzima livre. A pequena diferença entre os valores de  $K_m$  e  $K_{map}$  mostrou interferência mínima sobre a afinidade da enzima pelo substrato pirogalol. A HRP imobilizada mostrou estabilidade ao armazenamento superior àquela obtida com a enzima livre (90 dias com 100% da atividade inicial). Além disso, também foi possível a reutilização do sistema PET-PANIG-HRP por cinco vezes, com manutenção de 70% de atividade após uso e armazenamento por 60 dias. Para a tripsina, o suporte PET-PANIG apresentou menor capacidade de retenção de enzima (16,33%), mesmo sob condições otimizadas. As melhores condições determinadas para o processo foram: tempo de imobilização de 60 min, temperatura de 4°C, concentração de enzima de 0,02 mg mL<sup>-1</sup> e pH 7,6. Entretanto, a tripsina imobilizada reconheceu todos os substratos testados (leite desnatado, gelatina e soro albumina). O suporte também conferiu à enzima maior estabilidade em relação à enzima livre e, assim como para a HRP, foi possível reutilizar a tripsina por três vezes, com manutenção de 83% de atividade por seis dias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estabilidade, imobilização, peroxidase, tripsina.

**ABSTRACT:** Enzyme immobilization is a widely used technique when it is intended to obtain an increase in precision of the catalyzer systems as well as some characteristics that allow cost reduction, such as stability and the possibility to reuse the system. In this research a support was developed that is capable to immobilize two classes of enzymes, which was synthesized from PET strips hydrazinolysis, followed by PANI synthesis over its surface. This material was characterized by infrared spectra and photomicrography, and then underwent immobilization tests with the enzymes *horseradish* peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) and trypsin (EC 3.4.21.4). The results obtained in the immobilization tests were compared to the kinetic behavior of native HRP and trypsin. The support characterization showed that the hydrazinolysis reaction was effective to expose reactive groups in PET molecule, besides being a determinant factor of intensity degree of PANI. Immobilization of HRP showed to be a viable process, with 40% of enzyme activity retention under the following conditions: immobilization for 90 min, temperature of 4°C, enzyme concentration of 0.01 mg mL<sup>-1</sup> and pH 4.5. The reaction parameters showed some alterations when compared to free HRP. The optimum pH of the reaction was 7.0 and the enzyme continued to recognize its substrates after the immobilization process, although it presented a different reactivity compared to the native form. The tiny difference between the values of  $K_m$  and  $K_{mapp}$  showed a minimum interference on the enzyme affinity for pyrogallol substrate. The immobilized HRP showed higher storage stability than the free enzyme (100% of its initial activity for 90 days). Besides, the PET-PANIG-HRP system could be reused five times maintaining 70% of activity after 60 days of reuse and storage. For trypsin, the support PET-PANIG presented lower capacity of enzyme retention (16.33%), even under optimized conditions. The best conditions determined for the process were: immobilization for 60 min, temperature of 4°C, enzyme concentration of 0.02 mg mL<sup>-1</sup>, and pH 7.6. However, the immobilized trypsin recognized all substrates tested (skimmed milk, gelatin, and serum albumin). The support also gave the enzyme a higher stability in relation to the free enzyme and, as observed for HRP, it was possible to reuse trypsin three times maintaining 83% of its initial activity for six days.

**KEY-WORDS:** Stability, immobilization, peroxidase, trypsin.