

BIO-OXIDAÇÃO DE EUGENOL E ISOEUGENOL UTILIZANDO PEROXIDASE DE RABANETE.

Maíra Luane Sampaio de almeida¹; Heiddy Marquez Alvarez², Angélica Maria Lucchese³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando Licenciatura em Química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: luane.maira@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheiddy@gmail.com
3. Co-orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

INTRODUÇÃO

A biotransformação é um processo onde substâncias químicas se transformam em outras de maior valor agregado, através de métodos biológicos especificamente, quando os métodos químicos não trazem bons resultados. As indústrias químico-farmacêuticas procuram cada vez métodos biológicos com o objetivo de obter as substâncias desejadas com um custo trivial.

O uso e ampliação de métodos biotecnológicos na transformação de algumas substâncias tem-se mostrado eficiente principalmente quando a obtenção do produto é de interesse comercial. A vanilina, derivado do eugenol e isoeugenol, tem grande aplicação em indústrias farmacêuticas e também como flavorizantes.

O uso e ampliação de métodos biotecnológicos utilizados para transformar algumas substâncias tem-se mostrado eficiente principalmente quando a obtenção do produto é de interesse comercial. A vanilina, derivado do eugenol e isoeugenol, tem grande aplicação em indústrias farmacêuticas e também como flavorizantes.

As peroxidases e as feniloxidase são enzimas oxidantes, encontradas no rabanete. As peroxidase podem ser encontradas em múltiplas isoformas na maioria das espécies de frutas e vegetais, sendo relacionada com alterações no flavor, textura e cor durante o armazenamento e decomposição de frutas e vegetais. Na indústria de papel e celulose, a peroxidase, é utilizada na etapa de branqueamento da polpa. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em detergentes de lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem.

As cloroperoxidase, por exemplo, podem catalisar a epoxidação de algumas olefinas, mostrando-se versáteis na catálise de reações de oxidação (ALLAIN, 1993). As peroxidase também promovem a epoxidação assimétrica sob condições brandas de alguns substratos. (TUYNMAN, 2000) No entanto, não existem exemplos da utilização de peroxidase como catalisadores em síntese orgânica industrial, já que a produção em pequena escala limita seu uso. Em particular, as heme peroxidase são desativadas por oxidantes, o que resulta numa baixa estabilidade operacional. (VAN, 2001) A limitada solubilidade dos substratos orgânicos em sistemas aquosos e a inativação da enzima durante a catálise afeta a aplicação das enzimas em sínteses orgânica. Geralmente, um meio não aquoso pode alterar a estrutura, função e atividade catalítica da enzima sem

desnaturalizar-la por completo, (KANERVA, 1989), utilizando-se misturas de solventes orgânicos para diminuir estes efeitos. (AZEVEDO 2001)

Este trabalho visa o estudo da oxidação de propenilbenzenos, como eugenol e isoeugenol em vanilina utilizando como catalisadores a enzima peroxidase extraída do *Raphanus sativus*, L. (rabanete) pertence à família Brassicaceae a qual se desenvolve muito bem em regiões de clima temperado.

MATERIAL, MÉTODOS OU METODOLOGIA

Os estudos de biooxidação foram realizados utilizando os extratos brutos enzimáticos isolados do rabanete.

Procedimentos Gerais para a extração de enzimas.

A extração da enzima foi feita conforme procedimento descrito na literatura, que segundo os autores mantém a atividade peroxidásica por longos períodos (FATIBELLO-FILHO E VIEIRA, 2002). O tecido vegetal é lavado, fracionado em porções de 250g e estocado a -10°C . Para obtenção do extrato bruto, cada porção será homogeneizada em liquidificador industrial com 500mL de tampão fosfato 100mM pH 6.5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Vetec). Posteriormente o extrato é filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 6.500 rpm (centrifuga Nova Técnica NT815), durante 30min a 4°C . O sobrenadante foi mantido a 4°C .

Determinação da Atividade Peroxidásica.

A atividade enzimática foi determinada por método colorimétrico, baseado na mudança de absorvência a 470nm devido a formação do produto de oxidação do guaiacol (Reagem), o tetraguaiacol durante cinco minutos. O ensaio contém 2,77 a 2,79 mL de tampão fosfato 100 mM (pH6,0); 0,01 a 0,03 mL do preparado enzimático diluído dez vezes em tampão pH6,0; 0,1 mL de solução de guaiacol 100 mM e 0,1mL de H_2O_2 2,0mM (Vetec), a 25°C . Para dosagem de atividade das amostras liofilizadas, cerca de 10mg foram suspensos em 0,5mL de tampão fosfato pH 6,0. Uma unidade de enzima (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de fornecer 1 mmol de produto em 1 min a 25°C , no pH específico para esta reação. ϵ tetraguaiacol= $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HIRATA et al., 1998).

Bio-oxidação de Isoeugenol e eugenol

A literatura aponta que HRP é bastante estável em etanol 20% (AYYAGARI et al, 2002), portanto este solvente foi utilizado como meio reacional para as reações de oxidação com a enzima comercial. As reações foram conduzidas variando-se as proporções de substrato: peróxido de hidrogênio, a quantidade de enzima no meio reacional, o tempo de reação e a quantidade de agente oxidante, peróxido de hidrogênio. A extração dos produtos foi feita com CH_2Cl_2 e a fase orgânica tratada com Na_2SO_4 anidro. A análise dos produtos será feita por GC e GC-MS, com a injeção prévia de padrões de substrato e epóxido em cada análise.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Na tabela 1 se apresenta um resumo da actividade peroxidásica do rabanete utilizando o sistema guaiacol/ H_2O_2 (100mM).

Tabela 1. Atividade peroxidásica do rabanete.

Parâmetros	Rabanete	
	Extrato Bruto	Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ (85%)
Volume [mL]	30,0	4,5
Concentração de Proteína [mg/mL]	0,72	2,50
Proteína Total	21,6	11,3
Atividade Enzimática [U/mL]	3,2	16,8
Atividade Específica [U/mg]	13,3	20,1
Atividade Total [U]	96	76
Recuperação [%]	100	78

Como se pode observar na tabela 1, a precipitação de proteína do extrato bruto de rabanete foi eficiente, devido ao aumento (51%) da actividade específica e ao alto grau de recuperação (78%). Este resultado demonstra que o processo utilizado foi eficiente.

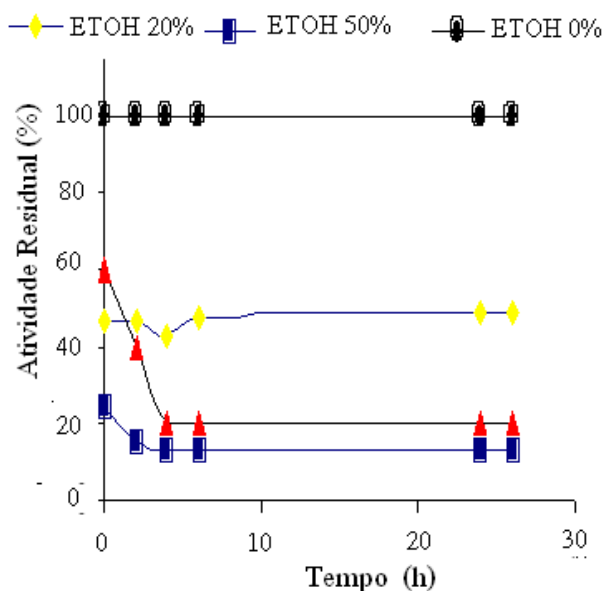


Figura 1. Atividade residual de Peroxidase de Rábano na presença de C₂H₅OH ao 20 e 50%.

Esta etapa de precipitação da proteína foi indispensável, já que a enzima ganha estabilidade ao estar isolada do solvente orgânico. Na figura 1 se pode observar o comportamento da estabilidade da enzima frente ao etanol. A solução proteica do rabanete, após 26 horas de incubação em etanol 20%, apresenta cerca de 50% de sua atividade inicial. Em etanol 50%, mesmo intervalo de tempo, a atividade residual foi de apenas 15%. A concentrações maiores de etanol a enzima não apresentou atividade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises cromatográficas das reações ainda estão sendo realizadas. Até o presente momento não temos o resultado final da conversão da reação de oxidação do isoeugenol e do eugenol, o Laboratório de Produtos Naturais possui uma grande quantidade de amostras para serem analisadas exigindo uma demanda de tempo maior do que a prevista inicialmente. Acreditamos que para o mês de outubro estas análises já tenham sido concluídas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIN, E. J.; Hager, L. P.; Deng, L.; Jacobsen, E. N. **Highly enantioselective epoxidation of disubstituted alkenes with hydrogen peroxide catalyzed by chloroperoxidase.** *J. Am. Chem. Soc.*, v.115, pp.4415-1146, 1993

AYYAGARI, M. S. R.; Kaplan, D. L.; Chatterjee, S.; Walker, J. E.; Akkara, J. A. **Solvent effects in horseradish peroxidase-catalyzed polyphenol synthesis.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, pp.3-9, 2002.

AZEVEDO, A. M.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L.P. **Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures.** *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.15, pp. 147-153, 2001.

DEXTER, A. F. Lakner, F. J. Lakner, R. A. Hager, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 6412.

FATIBELLO-Filho, O.; Vieira, I. C.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 455

KANERVA L. T. Klibanov A. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 6864. K. Ryu, J. S. Dordick. *Biochemistry*, 1992, 31, 2588.

TUYNMAN A. J. L. Spelberg, I. M. Kooter, H. E. Schoemaker, R. Wever. *J. Biol, Chem.* 2000, 275, 3025

VAN F, de Velde. Rantwijk, R. A Sheldon. **Trends in Biothecnology** 2001, 19, 73.