

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

**Maíra Luane Sampaio de almeida<sup>1</sup>; Heiddy Marquez Alvarez<sup>2</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>3</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando Licenciatura em Química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [luane.maira@gmail.com](mailto:luane.maira@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [marquezheiddy@gmail.com](mailto:marquezheiddy@gmail.com)
3. Co-orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [angelica.lucchese@gmail.com](mailto: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  $-10^{\circ}\text{C}$ . 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  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **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  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0mM (Vetec), a  $25^{\circ}\text{C}$ . 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  $25^{\circ}\text{C}$ , no pH específico para esta reação.  $\epsilon$  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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e a fase orgânica tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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/  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100mM).

**Tabela 1.** Atividade peroxidásica do rabanete.

Parâmetros	Rabanete	
	Extrato Bruto	Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (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.

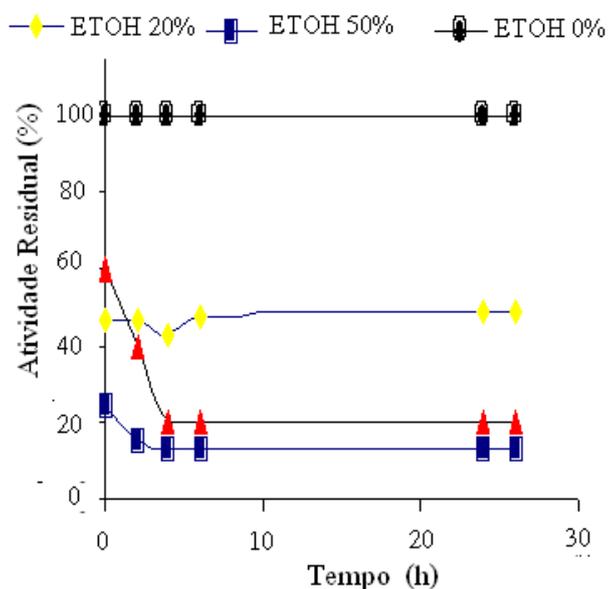


Figura 1. Atividade residual de Peroxidase de Rábano na presença de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ao 20 e 50%.

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.