

Aurélio Bettoni da Silva 107069

Gabriel R. Munhoz 106802

João Vítor Batistão 108074

## **Comparação de suportes para a enzima Tripsina**

Maringá, PR

31.10.2021

# Sumário

0.1	<b>Introdução</b> . . . . .	2
0.2	<b>Revisão Bibliográfica</b> . . . . .	3
0.3	<b>Análise e Resultados</b> . . . . .	5
0.4	<b>Conclusão</b> . . . . .	6
	<b>REFERÊNCIAS</b> . . . . .	7

## 0.1 Introdução

As enzimas são proteínas que atuam em diversas reações como catalisadores químicos. Assim, a utilização de enzimas tanto na indústria como até mesmo em corpos orgânicos traz diversos benefícios como a diminuição do tempo de reação e menor custo energético. (NELSON; COX, 2002)

Com o avanço da tecnologia e a capacidade de analisar melhor esses polímeros biológicos verificou-se a existência de imobilização natural das enzimas por meio de interações eletrostáticas. Ou seja, um confinamento físico das enzimas permitindo um aumento da produtividade devido ao aumento da concentração das enzimas. (COVIZZI et al., 2007)

Após a descoberta dessa imobilização natural foi iniciado o desenvolvimento de imobilizadores artificiais que utilizam de ligações covalentes para encapsular as enzimas e assim conseguir o mesmo efeito das imobilizações naturais. Segundo Cardoso, Moraes e Cass (2009) esse processo de desenvolvimento teve um grande avanço a partir da década de 70, impulsionando assim a utilização de enzimas imobilizadas. (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009)

Uma das enzimas que é muito utilizada em sua forma imobilizada é a Tripsina que em sua forma inativa é chamada de tripsinogênio e que tem entre suas principais funções a catálise da hidrólise em regiões C-terminais dos resíduos de lisina e arginina assim como a hidrólise das ligações de éster e amida de alguns substratos sintéticos. (FURLANI et al., 2020)

Na indústria essa utilização de imobilizadores gerou uma grande mudança, já que com a utilização de enzimas e células imobilizadas os custos diminuíram pois, para se obter os mesmo resultados se tornou necessário uma menor quantidade de insumos e reatores com volumes fixos acabaram tendo um aumento de produtividade.

## 0.2 Revisão Bibliográfica

A imobilização como já descrita é a utilização de um suporte para confinar enzimas ou outros elementos biológicos em um espaço confinado. Essa imobilização pode ser natural ou artificial, sendo formada por interações eletrostáticas ou ligações covalentes.

O artigo selecionado para estudo sobre a comparação de suportes é um estudo sobre a enzima Tripsina, uma proteína muito utilizada para digestão de proteínas para estudo do middle-down, uma abordagem de estudo para análises proteômicas.

Assim, para se obter o menor custo e maior produtividade e assertividade ao realizar essa digestão proteica é necessário imobilizar a Tripsina, o estudo em questão de Furlani, Amaral, Oliveira e Cass traz um comparativo de diversos suportes para a Tripsina. Por meio dessa comparação é possível analisar quais são as melhores combinações de suporte para a Tripsina nas condições definidas, para assim obter a melhor produtividade com o menor custo.

O artigo realiza uma análise dos resultados obtidos de 4 outros textos sobre a diferentes suportes e ou formatos de suportes para a tripsina com aplicação em proteólise, são eles:

1. Bao, H.; Zhang, L.; Chen, G.; J. Chromatogr. A 2013, 1310, 74.
2. Ge, H.; Bao, H.; Zhang, L.; Chen, G.; Anal. Chim. Acta 2014, 845, 77.
3. Cao, Y.; Wen, L.; Svec, F.; Tan, T.; Lv, Y.; Chem. Eng. J. 2016, 286, 272.
4. Naldi, M.; Cernigoj, U.; Strancar, A.; Bartolini, M.; Talanta 2017, 167, 143.

O primeiro realiza um estudo do suporte quitosana na superfície de mini lâmpadas incandescentes, enquanto o segundo se utilizou de óxido de grafeno para preparar um revestimento biocompatível nos canais de microchips de polimetilmetacrilato através de uma solução sol-gel para imobilização covalente da tripsina.

O terceiro artigo traz nanopartículas magnéticas de  $Fe_3O_4$  como suportes para a tripsina, uma delas revestida com ouro e a outra com cobre ( $Cu^{2+}$ ). Por fim, o último artigo utiliza uma coluna preenchida com monolito à base de sílica (tryp-IMER).

Cada um traz resultados diferentes, pois parte de um ponto de vista único. E essa análise traz consigo um conteúdo muito rico para auxiliar na escolha de um suporte para a tripsina. Para facilitar a visualização dos resultados de todos os artigos e ter um padrão no momento de comparação e análise foram escolhidos apenas suportes desses artigos que possuísem uma superfície de contato adequada, porosidade adequada, não ser um suportes solúvel, estabilidade mecânica e rigidez, alta afinidade com a proteína, possibilidade de

reuso, disponibilidade de grupos funcionais reativos e principalmente baixa toxicidade e baixo custo.

### 0.3 Análise e Resultados

Por meio da coleta das informações de cada artigo foi possível realizar um compilado de todos os suportes na tabela 1. (FURLANI et al., 2020)

Tabela 1 – Levantamento das principais estratégias de imobilização da tripsina utilizadas em abordagens proteômicas

Suporte	Técnica de imobilização	Tempo de digestão		Proteína avaliada	Cobertura sequencial
		Sol.	Imob.		
Nanofolhas de MoS <sub>2</sub>	Covalente	12 h	5 min	BSAa	84%
Óxido de Grafeno	Covalente	12 h	1 min	BSAa	83%
Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> modificada com taninos	Covalente	18 h	1 min	BSAa	84%
Grafeno magnético revestido com glutaraldeído	Covalente	12 h	2 min	BSAa, Cyt cb e MYOc	87%, 87% e 95%
Sílica revestida com glicidil metacrilato (GMA)	Covalente	12 h	1 min	BSAa	92%
Grafeno magnético revestido com polidopamina	Covalente	16 h	10 min	Cyt cb e MYOc	62% e 83%
Partículas magnéticas funcionalizadas com NHSj e EDCK	Covalente	4 h	2 min	Proteínas de E. coli	64%
Partículas magnéticas revestidas com NHSj e EDCK	Covalente	12 h	1 min	BSAa	90%
Capilar preenchido com monólito de polímero (GMAI-co-AAmm-co-MBA)	Covalente	15 h	25 min	HSAg, $\beta$ -caseína, RNase Bb	78,2%, 49,7% e 80,6%
Fibra de vidro recoberta com óxido de grafeno e quitosana	Adsorção iônica	12 h	10 s	BSAa, MYOc, Cyt cb e Hbd	49%, 78%, 70% e 71%
Capilar preenchido com monólito de polímero (GMAI-co-AAmm-co-MBA)	Adsorção física	24 h	50 s	BSAa	47%
Coluna preenchida com monólito de polímero (GMAI e EDMAo)	Covalente	24 h	88 s	MYOc	-
Capilar com monólito de sílica	Covalente (quelção entre espaçador-Cu <sup>2+</sup> -enzima)	12 h	50 s	BSAa e MYOc	26% e 91%
Ponteira (in-tip) preenchida com monólito de polímero (GMAI e DVb)	Adsorção	12 h	2 min	BSAa, MYOc e a-caseína	78%, 89% e 83%
Capilar preenchido com monólito de sílica	Covalente	5 h	3,5 min	MYOc e BSAa	90% e 34%
Nanofibras de polímero (PSq e PSMAr)	Ligação cruzada	16 h	6 h	BSAa	34%
Microesferas de sílica	Covalente	12 h	5 min	BSAa e Cyt cb	54% e 83%
Minidisco de monólito de polímero (EDAs)	Covalente	24 h	10 min	Cyt cb, MYOc, AGPi, OVAe e BSAa	63%, 99%, 45%, 50% e 73%
Fibra de vidro revestida com sílica	Covalente	12 h	10 s	BSAa e Cyt cb	45% e 77%
Fibra de vidro revestida com quitosana	Adsorção iônica	12 h	5 s	BSAa e LIze	40% e 64%
Microesferas de sílica	Covalente	-	15 s	BSAa e MYOc	24% e 80%
Nanotubo de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Ligação Cruzada	12 h	5 min	BSAa, MYOc e LIze	46%, 81% e 63%
Nanopartículas magnéticas revestidas com amina	Covalente	12 h	15 s	BSAa, MYOc e Cyt cb	38%, 80% e 76%
Microesferas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Covalente	12 h	15 s	Cyt cb	76%
Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Covalente	12 h	10 s	BSAa, Cyt cb e MYOc	43%, 83% e 79%

Ge e colaboradores conseguiram diminuir o tempo de reação de 12h para apenas 5 minutos, o método também conseguiu atingir coberturas sequenciais entre 91% e 52%. Segundo Furlani et al. o método realizado foi simples, eficiente e de baixo custo.

Enquanto Bao e seus colaboradores com sua abordagem atingiram um excelente ambiente enzimático sem autólise e desnaturação das enzimas. Além disso conseguiram ótimas coberturas sequenciais de 95%, 76%, 69% e 55% com uma minimização do consumo de reagentes por meio da diminuição do tempo de digestão.

Segundo Sun, o suporte ideal para digestão deve ser hidrofílico e neutro. No experimento realizado por ele e seus colaboradores a digestão da mioglobina foi realizada em apenas 15 minutos com cobertura sequencial de 68,8% com o revestimento de Cu<sup>2+</sup>, enquanto o revestimento de ouro obteve uma cobertura muito maior de 93,8%.

Por último o uso da coluna de monólito à base de sílica proporcionou um tempo de digestão de 90 segundos, porém com coberturas baixas, entre 37,5% e 24,0%. O biorreator contudo, ainda é eficiente segundo Naldi, pois esse ponto negativo relacionado à cobertura sequencial é compensada pelo baixo custo de preparo do mesmo.

## 0.4 Conclusão

Portanto, é inquestionável o menor tempo de digestão quando utilizada a tripsina com suportes adequados, eles possibilitam esse menor tempo de ingestão, maior número de peptídeos alcançados e baixos valores de clivagens perdidas. Nesse caso da Tripsina é difícil mensurar quais foram os suportes mais eficientes, já que alguns mesmo possuindo grande cobertura sequencial não conseguiram diminuir tanto o tempo de reação e vice-versa. Assim, é necessário analisar o processo que irá ser realizado e verificar entre os suportes que tiveram melhores tempos quais são aqueles que entram no orçamento e são mais fáceis de serem adquiridos e manuseados. Sempre é necessário alencar que um processo para ser eficiente, deve ser simples e produzir o máximo possível com menor custo.

Segundo Furlani et al. a automação deve melhorar ainda mais esse processo de escolha dos suportes pois proporcionará uma maior reprodutibilidade dos processos de digestão e um controle melhor de todo o ciclo. Assim é interessante concluir que esses experimentos para escolha de suportes e imobilizadores são essenciais para continuar aumentando a eficiência de processos e diminuindo os seus custos, pois sempre é possível testar algo novo, sendo um novo suporte ou algum modo novo de preparar ou organizar esse suporte com a enzima. Espera-se que novos suportes sejam desenvolvidos e que sejam ainda mais compatíveis com as enzimas e células alvo.

## Referências

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. d.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 32, p. 175–187, 2009. [2](#)

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, n. 2, p. 143–160, 2007. [2](#)

FURLANI, I. L. et al. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 43, p. 463–473, 2020. [2](#), [5](#)

NELSON, D. L.; COX, M. M. Leninger princípios de bioquímica. In: *Leninger princípios de bioquímica*. [S.l.: s.n.], 2002. p. 975–975. [2](#)