

Foto: Gustavo Adolfo Saavedra Pinto



Imobilização de Tanase em Suportes Vítreos Utilizando γ -aminopropiltriétoxilano (ATPS)

Ariana Farias Melo¹
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto²
Luciana Rocha Barros Gonçalves³
Andrea Lopes de Oliveira Ferreira⁴

Tanino-acil-hidrolase (E.C. 3.1.1.20), usualmente chamada de tanase, catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas de vários taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico. Essa enzima pode ser encontrada em diferentes vegetais, porém, seus principais produtores são os microrganismos, destacando-se os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

A aplicação industrial dessa enzima é bastante diversa, atuando nas indústrias de alimentos, na produção de antioxidantes; de bebidas, diminuindo a turbidez de bebidas ricas em compostos fenólicos, como também na preparação de chás gelados instantâneos, preservando, assim, os componentes responsáveis pelo sabor; na indústria de ração animal, removendo compostos indesejáveis, promovendo o aumentando da digestibilidade e favorecendo a assimilação de certos nutrientes; e no tratamento de efluentes de curtumes que apresentam altas quantidades de polifenóis.

As enzimas protéicas são constituídas por longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. Estão presentes em todas as células vivas onde desempenham

uma função vital, controlando processos metabólicos. Devido à sua eficácia, à sua ação específica, às condições amenas em que atuam e ao seu alto grau de biodegradabilidade, as enzimas são apropriadas para uma ampla gama de aplicações industriais.

Apesar de suas enzimas serem excelentes catalisadores, sua aplicação industrial pode ser limitada, em razão de alguns fatores, como: solubilidade em água; menos estáveis quando comparadas com catalisadores químicos; de uma forma geral, não poderem ser usadas em solventes orgânicos; não resistirem a temperaturas elevadas e estarem presentes em baixas concentrações, conseqüentemente, seu processo de purificação se torna mais difícil, tornando seu custo elevado e muitas vezes não sendo economicamente viável a sua separação do produto final.

Desta forma, a imobilização de enzimas pode minimizar ou até mesmo eliminar problemas encontrados com as enzimas livres. Segundo Chibata (1978), enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas e que podem

¹ Graduanda em Engenharia de Alimentos/UFC - Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa Agroindústria Tropical

² Químico Tecnológico, D.Sc., Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, Cep 60511-110, Fortaleza, CE. E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

³ Eng. Química, D.Sc., Profa. Adjunta do Dep. de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, CE, Caixa Postal 12168, Cep 60356-000, Fortaleza, CE

⁴ Eng. Química, D.Sc., Profa. Visitante do Dep. de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, CE.

ser utilizadas de forma contínua e ou repetidas vezes. Em termos de processos enzimáticos, a imobilização dos biocatalisadores traz vantagens como: aumento da estabilidade, do nível de controle do processo, do rendimento e da pureza do produto final, além de possibilitar o uso de reatores de diferentes configurações (Chibata & Tosa, 1978).

A imobilização de enzimas por ligações covalentes ocorre por meio de combinações químicas entre grupos reativos do suporte e grupos funcionais da enzima que não são essenciais para a atividade catalítica, porém poucos suportes contêm esses grupos reativos que permitam o acoplamento direto (suporte-enzima), necessitando, na maioria das vezes, de uma silanização ou de uma ativação, ou até mesmo dos dois.

Esse tipo de processo apresenta algumas vantagens em relação aos outros existentes na literatura, podemos citar: grande força de ligação, com conseqüente estabilidade do complexo suporte-enzima; alta retenção de sua atividade; e a alteração ocorrida na enzima com a ligação ao suporte pode ser favorável, porém é um método mais complexo.

Dentre a grande variedade de suportes para imobilização

de enzimas, os inorgânicos apresentam uma série de vantagens, tais como: elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a ataque de microrganismos e de solventes orgânicos (Hernández-Jústiz et al., 1998). Além disso, os materiais inorgânicos não apresentam modificação na sua estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Sabe-se, também, que as propriedades dos preparados de enzima imobilizada são governadas pelas características da enzima e do suporte usados (Tischer & Kasche, 1999), bem como pela estratégia de imobilização empregada (Cárdias et al., 1999). Essas interações são responsáveis pelas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas do sistema imobilizado suporte-enzima.

O processo proposto a seguir trata de ligar covalentemente uma enzima a um suporte vítreo (sílica), após silanização e ativação com glutaraldeído. O processo de silanização refere-se à formação de uma ponte orgânica no suporte por meio da reação com γ -aminopropiltrióxido (ATPS), onde o radical etil do ATPS reage com o grupo silanol do suporte, gerando uma terminação amina, que será ativada com o glutaraldeído, formando grupo aldeídos necessários para permitir a ligação enzima-suporte (Fig. 1).

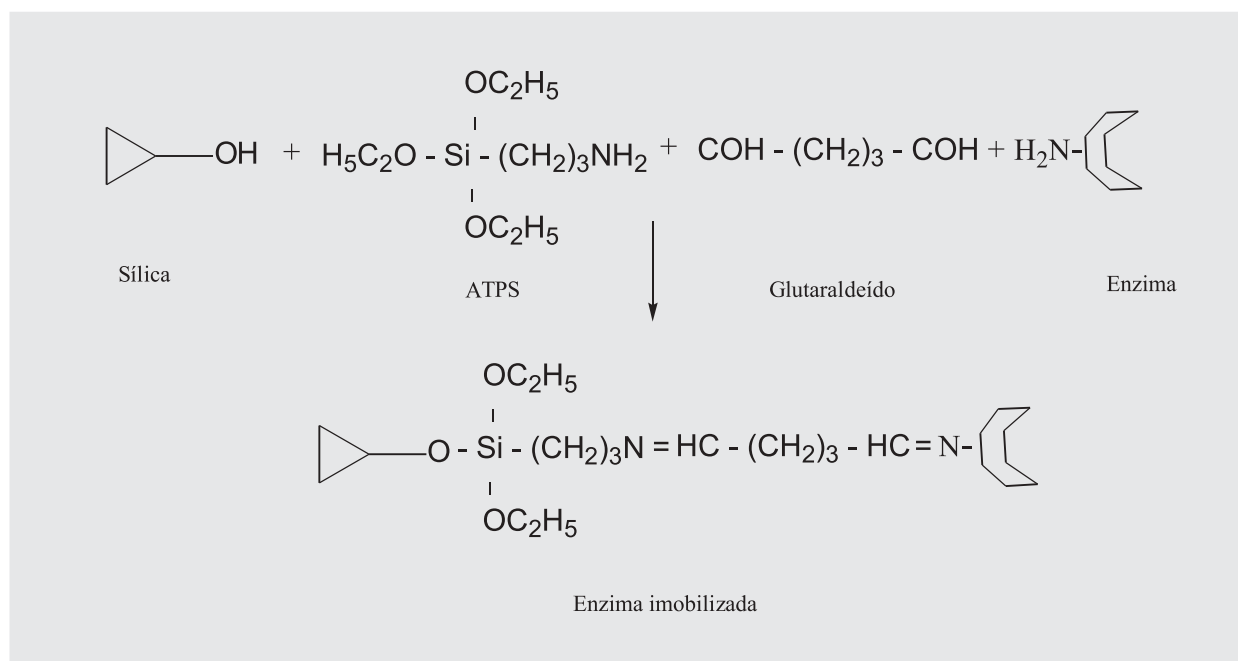


Fig. 1. Esquema da imobilização de enzimas em sílica, utilizando-se APTS.

Seqüência do processo de imobilização

Suporte utilizado

Sílica macroporosa com granulometria de 150 a 300 μm , com porosidade igual a 0,57 e diâmetro médio de poro de 270 Å. A Fig. 2 mostra o suporte utilizado neste trabalho.

Foto: Gustavo Adolfo Saavedra Pinto



Fig. 2. Fotografia do suporte (sílica macroporosa) utilizado neste trabalho para imobilização da tanase.

Etapa I – Limpeza

Inicialmente, o suporte deve ser colocado em mufla a 370 °C por três horas e, em seguida, protonado com solução de ácido nítrico 10%_{v/v} durante 30 minutos à temperatura ambiente na razão de 30 mL por grama de suporte.

Etapa II – Lavagem e secagem

Após a etapa de limpeza, o suporte deve ser, primeiramente, lavado exaustivamente com água ultra-pura. Em seguida, lava-se, também, com soluções de aquosas com concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75% e 100%_{v/v}), na razão de 10 mL de solução por grama de suporte. Ao final da última etapa de lavagem, o suporte deverá ser colocado a 40 °C por uma hora para secagem.

Etapa III – Silanização

A silanização do suporte será feita com solução de ATPS 0,5%_{v/v}, pH 3,3 à 75 °C por três horas, na razão de 3 mL de solução por grama de suporte.

Etapa IV – Lavagem e secagem

Após a silanização, repete-se a etapa de lavagem e secagem descrita anteriormente (etapa II).

Etapa V – Ativação e Imobilização

O suporte silanizado será ativado com solução de glutaraldeído a 2,5%_{v/v} em tampão fosfato 100 mM, pH

7,0 por uma hora a 23 °C. Utiliza-se a razão de 3 mL de solução por grama de suporte. Após a ativação, o suporte será exaustivamente lavado com água ultra-pura. Após a lavagem, deve-se iniciar imediatamente a etapa de imobilização, adicionado ao suporte uma solução de tanase em tampão acetato 20 mM, pH 5,0 na razão de 20 mL de solução por grama de suporte. A imobilização será realizada a 20 °C por cinco horas, sob agitação moderada.

Agradecimentos

Ao Prof. Henrique Celso Trevisan do Instituto de Química da UNESP pela doação das amostras de sílica.

Referências

- CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUIBAN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.141-148, 1999.
- CHIBATA, I. Industrial application of immobilized enzyme-systems. *Pure and Applied Chemistry*. v.50, n.7, p.667-675, 1978.
- CHIBATA, I.; TOSA, T. Immobilisation enzymes and immobilized microbial-cells. *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, v.36, n.11, p.917-930, 1978.
- HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUIBAN, J.M. Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v.59, n.1, p.73-79, 1998.
- TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystal or carriers? *Trends in Biotechnology*, v.17, p.326-335, 1999.
- PINTO, G.A.S. *Produção de tanase por Aspergillus niger*. 2003. 209p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- VITOLLO, M. Imobilização de enzimas. In.: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biologia Industrial*. São Paulo: E. Edgard Blücher. 2001. v.3, p.391-404.

Comunicado Técnico, 109

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical

Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (0xx85) 3299-1800

Fax: (0xx85) 3299-1803 / 3299-1833

E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição *on line*: dezembro de 2005

Comitê de Publicações

Presidente: *Valderi Vieira da Silva*

Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Membros: *Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo,
Marlos Alves Bezerra, Levi de Moura Barros, José
Ednilson de Oliveira Cabral, Oscarina Maria Silva
Andrade e Francisco Nelsieudes Sombra Oliveira.*

Expediente

Supervisor editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Revisão de texto: *Maria Emília de Possídio Marques*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Fátima Costa Pinto.*