



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP
Telefone: (16) 274 2477 - Fax: (16) 272 5958 - e-mail: postmaster@cnpdia.embrapa.br

ISSN 1413-8808

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 16, ago/97, p.1-4

FILTROS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS

Odilio Benedito Garrido Assis¹
Luis Alberto Colnago²

A contaminação de efluentes por resíduos de origem agroindustrial, em especial a presença de fertilizantes e defensivos agrícolas tem sido objeto de preocupações crescentes, principalmente considerando a expansão das áreas agricultáveis e o uso indiscriminado desses implementos. Não são raros também os rejeitos do processamento agropecuário, seja em média ou mesmo em pequena escala, que são diretamente acumulados "in natura" promovendo a absorção pelo solo e conseqüente contaminação de lençóis freáticos ou ainda diretamente eliminados em rios e efluentes sem qualquer tratamento prévio. Segundo Guitierrez, 1997, cerca de 80% das doenças e 65% do total das internações no Brasil, estão relacionados com a água, sendo as principais incidências a desenteria bacilar, coléra, febre tifóide, febre paratifóide, gastroenterite, diarreia infantil, esquistossomose e leptospirose, vindo em seguida as contaminações por poluentes químicos e derivados de diversas origens.

O tratamento e potabilização de águas contaminadas requer não somente uma filtragem do ponto de vista da retenção de material em suspensão como também uma ação direta por agentes biológicos que inoculem e degradem os contaminantes. Contudo, a quase totalidade dos filtros para esse fim, tem como base o princípio de contenção fracionada ou contínua de partículas ou colóides em suspensão, ou seja, a filtragem por "peneiramento", onde tem-se uma fração retentada (porção retida pela interrupção de sua passagem por orifício de menor diâmetro que suas dimensões) e uma fração permeada (porção passante). A eficiência desse tipo de separação é sem dúvida limitada em função das dimensões dos contaminantes, além de que a maioria dos materiais utilizados na confecção de filtros apresentam característica bioinerte, ou seja, há apenas uma interação física (retenção) sem nenhuma resposta a nível biológico com o filtrado.

¹ Físico, PhD, Embrapa Instrumentação, C.Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos, SP

² Farmaceutico-Bioquímico, PhD, Embrapa Instrumentação, C.Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos, SP

PA/16, CNPDIA, ago/97, p.2

A possibilidade de elevar a ação purificante desses sistemas tornando-os biologicamente ativos é área de desenvolvimento recente a nível mundial e praticamente inédita no Brasil, no tangente à construção de dispositivos e testes. Contudo, filtragens em escala laboratorial com presença de biofilmes de diversas origens tem apresentado eficácia na remoção de particulados contaminantes de água, sendo potencialmente interessantes para aplicações como barreiras na prevenção de poluição, na purificação e separação de agrotóxicos, microorganismos e no tratamento geral de águas residuárias (Weber-Shirk, M. & Dick, R., 1997).

A produção de filmes de lisozima ultra-finos controlados a nível molecular, tem sido objeto de pesquisa no Centro de Instrumentação da Embrapa (Herrmann P.S.P. et al., 1996), sendo esta enzima de alto poder bactericida e potencialmente interessante para a confecção de biofiltros.

A lisozima, também conhecida como muramidase, é uma enzima natural, termicamente estável, encontrada no colostro, clara de ovos e em mucosas e lágrimas humana. A lisozima é caracterizada por múltiplos e complexos grupos funcionais que apresentam regiões específicas de distribuição de cargas superficiais, definindo partes hidrofóbicas e hidrofílicas, segundo modelo apresentado por Kayushina et al., 1996. A literatura apresenta como principal ação antibacterial da lisozima a hidrólise de componentes das paredes celulares de bactérias. Esta produz também a quebra de ligações beta 1-4 entre N-acetil ácido D-muramico e N-acetil D-glucosamina, o que significa o rompimento das paredes celulares de bactérias gram positivas como Staph and Strep, e de outras viroses neutralizando infecções por microorganismos (Sinnott, 1993).

O substrato apropriado à imobilização da lisozima deve ser submetido a tratamento químico apropriado para geração de cargas superficiais, atraindo assim as porções eletricamente opostas das moléculas. Testes de bioatividade estão sendo conduzidos pela montagem de colunas de filtragens. Como o vidro é um dos materiais apropriados à geração de cargas superficiais e conseqüentemente à imobilização da lisozima, o meio de filtragem é constituído de fibra comercial de vidro (40-70 μm de espessura), e hidrofílicado segundo procedimentos já estabelecido (Herrmann, et al., 1996 e Assis, et al., 1997). Testes de confecção de membranas vítreas por sinterização de pó de vidro também estão igualmente em andamento.

A agregação da lisozima no substrato poroso se dá por auto-montagem, sendo o aspecto do depósito acompanhado por microscopia de força. O que se objetiva é a formação de uma rede enzimática como ilustrado na Figura 1, com manutenção da permeabilidade do meio. A remoção de bactéria *Escherichia coli* em solução aquosa é o meio contaminado testado.

PA/16, CNPDIA, ago/97, p.3

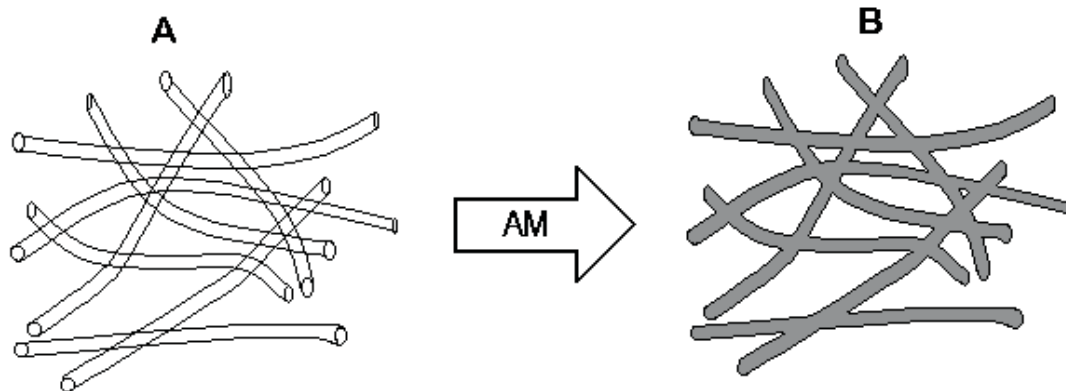


Figura 1 - Esquema ilustrativo da rede de enzimas desejada pela imobilização de lisozima em meio filtrante fibroso. Em (A) o empacotamento da lâ de vidro quimicamente tratada. Após a permanência em solução surfactante (AM = auto-montagem), as fibras são revestidas pela lisozima formando uma rede de enzimas (B)

No presente estágio da pesquisa quatro testes completos de filtração foram conduzidos e avaliados. A Figura 2 apresenta os resultados obtidos comparando-se a fração percentual de bactérias medida pela passagem nas colunas com e sem lisozima imobilizada. A eficiência da filtração é avaliada segundo equação proposta por Kawabata et al., 1996, que tem como base as diferenças na medida proporcional de bactérias no afluente e efluente coletado em placas, ou seja PFU (plaque-forming unit), segundo a relação:

$$\% \text{ Removida} = (\text{PFU}_{\text{AFLU}} - \text{PFU}_{\text{EFLU}}) / \text{PFU}_{\text{AFLU}} \times 100$$

cujas relações estão plotadas na Figura 3.

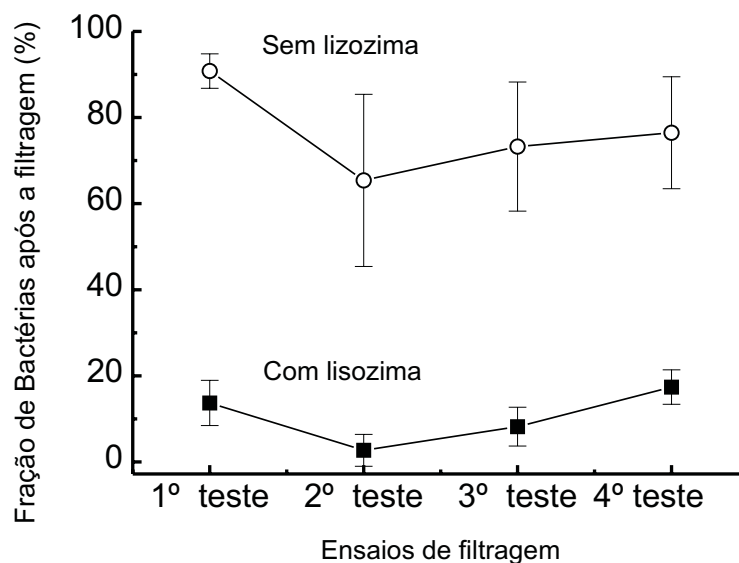


Figura 2 - Medida das frações de bactérias após passagem por jogos de colunas com e sem enzima imobilizada.

PA/16, CNPDIA, ago/97, p.4

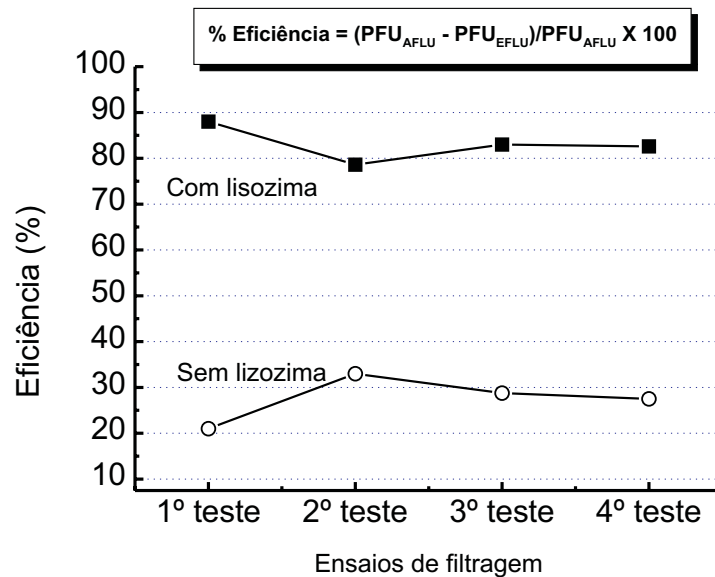


Figura 3 - Eficiência de filtragem segundo relação proposta por Kawabata et al., 1996.

Por esses resultados preliminares é significativo o efeito bactericida da lizozima imobilizada na remoção de *E. Coli*. Esses dados indicam potencial de aplicações dessa tecnologia na confecção de biofiltros que possam servir de coadjuvantes no tratamento de águas contaminadas. Os testes deverão ser ampliados numa segunda fase com o objetivo de avaliação de vida média de bioatividade e da eficiência na remoção de demais contaminantes, principalmente resíduos químicos e agroindustriais.

Referencias Bibliográficas

- ASSIS, O.B.G.; CLARO, L.C. & COLNAGO, L.A. (1997 a) "*Emprego de Lizozima imobilizada na purificação de águas contaminadas por bactérias*". 3º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC' 97, Anais... 28-31 Out. R. Janeiro, RJ (no prelo)
- GUITIERREZ, A.S.D., 1997. *A Contribuição do agricultor para o abastecimento de água urbana*. Informações Econômicas, SO. **27**[1]:5-7
- HERRMANN, P.S.P.; BORATO, C. E., MATTOSO, L.H.C., OLIVEIRA JR., O.N., COLNAGO, L.A. (1996) - *Fixação de proteínas em substrato sólido por técnica de 'self-assembly'*. in anais do XI SINAFERM, S.Carlos, SP, vol.1 p. 261
- KAYUSHINA, R.L.; STEPINA, N.D.; BELYAEV, V.V.; YU. I. KHURGIN, YU.I. - *X-ray reflectivity study of Self-assembly of ordered Lysozyme films*. Crystallography Reports **41**[1] (1996): 146
- KAWABA, N.; FUJITA, I.; INOUE, T. (1996) "*Removal of virus from water by filtration using microporous membranes made of Poly (N-benzyl-4-vinylpyridinium chloride)*". J. of Appl. Polym. Sc. **60**: 911-917
- SINNOTT, M.L. - *Glycosyl Group Transfer* in Enzyme Mechanisms (M.I. Page and . Williams eds.) The Royal Soc. of Chem. London (1993) p.259
- WEBER-SHIRK, M. & DICK, R.I., *Biological mechanisms in slow sand filters*. Journal AWWA, 89[2](1997):72