

Foto: Gustavo Adolfo Saavedra Pinto



Método para Determinação da Atividade de Tanase em Derivados Imobilizados

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

Apesar de as enzimas serem excelentes catalisadores, sua aplicação industrial pode ser limitada, devido a diversos fatores, como: custo de produção, alta solubilidade em água, menor estabilidade, quando comparadas com catalisadores químicos; baixa atividade a temperaturas elevadas e não ser viável sua recuperação após a utilização. Por outro lado, a imobilização de enzimas pode minimizar ou até mesmo eliminar alguns fatores limitantes apresentados pelas 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 ser utilizadas de forma contínua e/ou repetidas vezes.

A aplicação industrial da tanase, ou tanino-acil-hidrolase (E.C. 3.1.1.20), é bastante diversificada, usada na produção industrial de ácido gálico, cujo éster é utilizado como agente conservante, na indústria de alimentos para remover certas substâncias indesejáveis, na indústria de ração animal e no tratamento de efluentes de curtumes. Na indústria de alimentos, sua maior aplicação é no tratamento de folhas ou extratos de folhas de chá, para reduzir o

surgimento de turbidez em bebidas geladas, em virtude da presença de taninos. A tanase apresenta, também, grande potencial de aplicação em sucos de frutas tropicais ricos em taninos.

Inoue & Hagerman (1988), relatam um método para determinação de galotaninos, que envolve a formação de um complexo entre rodanina e ácido gálico, liberado após uma etapa de hidrólise ácida do tanino. O complexo, que possui absorvância máxima a 520 nm, resulta da reação da rodanina com os grupos hidroxil vicinais do ácido gálico. As moléculas de rodanina que não reagiram, não apresentam, em solução básica, absorvância em comprimentos de onda superiores a 450 nm. A rodanina apresenta baixa ou nenhuma afinidade pelos grupos hidroxil de radicais galoil presentes na estrutura dos taninos. A rodanina também pode reagir, em soluções alcalinas, com quinonas ou hidroquinonas, mas os produtos dessas reações absorvem comprimentos de onda maiores (Thies & Fischer, 1973). Dessa forma, esse método é muito útil para análises rotineiras, pois apresenta alta especificidade (sem interferência dos compostos vegetais fenólicos), sensibilidade e precisão.

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

O método de rodanina foi posteriormente adaptado por Skene & Brooker (1995) e Sharma et al. (2000) para determinação da atividade de tanase livre produzida por bactérias e por fungos, respectivamente. Pinto (2003) introduziu algumas modificações, visando a redução no volume de reagentes gastos e a substituição do metanol por etanol como solvente da rodanina.

Contudo, o método de análise da atividade livre não é adequado à quantificação da atividade imobilizada. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo relatar um método para a determinação da atividade de tanase imobilizada covalentemente a suportes inertes insolúveis, adaptado a partir do equivalente para enzima livre.

Materiais necessários

Reagentes

- Rodanina P.A.
- Ácido tânico P.A.
- Etanol absoluto P.A.
- Hidróxido de potássio P.A.
- Ácido acético glacial
- Acetato de sódio P.A.

Equipamentos e materiais

- Balança analítica e semi-analítica
- Banho termostático com agitação
- Placa de agitação
- Agitador de tubos de ensaio
- Pipetas graduadas (1, 10 e 20 mL)
- Tubos de ensaio médios
- Erlenmeyer de 100 mL
- Proveta de 50 e 1.000 mL
- Balão volumétrico de 100 e 1.000 mL
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Cubetas de vidro

Preparo de Soluções

Solução de ácido acético 200 mM (1.000 mL)

Diluir 11,6 mL de ácido acético glacial para 1.000 mL com água destilada em balão volumétrico, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Solução de acetato de sódio 200 mM (1.000 mL)

Dissolver 16,4 g de acetato de sódio ($C_2H_3O_2Na$) ou 27,2 g de acetato de sódio triidratado ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) em

500 mL de água destilada, transferir para um balão de 1.000 mL e completar com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Tampão acetato 20mM, pH 5,0 (1.000 mL)

Misturar 29,6mL da solução de ácido acético 200 mM com 70,4 mL da solução de acetato de sódio 200 mM e completar o volume para 1.000 mL.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Solução 100 mg/L de ácido gálico (1.000 mL)

Pesar em balança analítica 100 mg de ácido gálico; em seguida, dissolver em 200 mL de água destilada sob agitação constante, e transferir analiticamente para um balão volumétrico 1.000 mL e aferir o volume.

Essa solução **não** pode ser armazenada.

Solução de ácido tânico 0,05% em tampão acetato 20 mM pH 5,0 (100 mL)

Pesar em balança analítica 0,05 g de ácido tânico; em seguida, dissolver em 50 mL de tampão acetato 20 mM pH 5,0, transferir para um balão volumétrico 100 mL e aferir o volume.

Transferir o conteúdo para frasco de vidro etiquetado e armazenar em geladeira por, **no máximo**, dois dias.

Solução de hidróxido de potássio 0,5 N (100 mL)

Utilizando uma balança semi-analítica, pesar 2,8 g de hidróxido de potássio e dissolver em 50 mL de água destilada. Em seguida, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e aferir o volume.

A solução deve ser transferida para um frasco de plástico etiquetado, podendo ser armazenada à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução etanólica de rodanina 0,667% (100 mL)

Pesar, em balança analítica, 0,667 g de rodanina P.A. e dissolver em 50 mL de etanol absoluto P.A., com auxílio de bastão magnético e placa de agitação. Após total dissolução da rodanina, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e aferir o volume com etanol absoluto P.A.

A solução deve ser armazenada em geladeira por, **no máximo**, 15 dias em frasco de vidro devidamente etiquetado.

Curva-Padrão de Ácido Gálico

Preparo das soluções

A partir da solução padrão de ácido gálico, preparar em balões volumétricos de 100 mL, soluções variando a concentração de ácido gálico de 10 a 100 mg/L, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções para curva-padrão.

Solução de ácido gálico (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mg/L)
0	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90
100	0	100

Determinação da absorvância

Transferir para tubos de ensaios 0,4 mL de cada solução preparada. Adicionar 0,6 mL de solução etanólica de rodanina e homogeneizar vigorosamente; após cinco minutos, adicionar 0,4 mL da solução de hidróxido de potássio 0,5 N homogeneizar e deixar em repouso por 2,5 minutos. Em seguida, adicionar 8,6 mL de água destilada, homogeneizar vigorosamente e ler em espectrofotômetro a 520 nm.

O espectrofotômetro deve ser calibrado com amostra sem ácido gálico (água destilada).

Construção da curva

Plotar, em planilha ou calculadora científica, a absorvância no eixo Y contra a concentração de ácido gálico (mg/L) no eixo X (Fig. 1). A partir do coeficiente angular da reta ajustada, calcula-se o fator de concentração (Eq. 1).

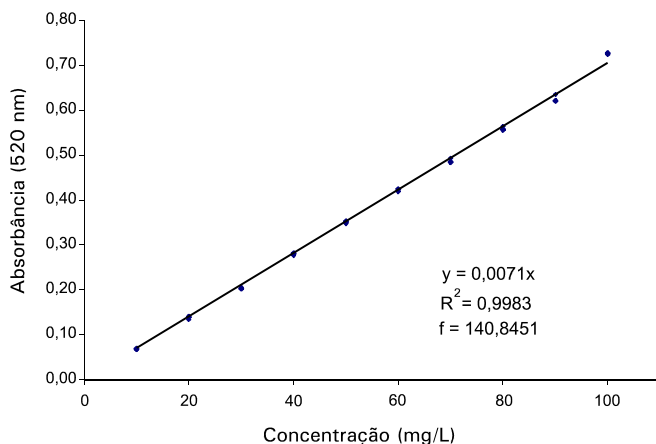


Fig. 2. Modelo de gráfico de curva-padrão.

$$\text{Fator} = \frac{1}{\text{Coef. angular}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Seqüência de Análise da Atividade do Derivado

Etapa I: Incubação do derivado

Em um erlenmeyer de 100 mL adicionar 20 mL da solução de ácido tânico 0,05%; em seguida, colocar no banho termostático a 50 °C, adicionar 0,1 g do derivado imobilizado de tanase e ligar a agitação.

A reação deve ser conduzida por 30 minutos.

Etapa II: Quantificação do ácido gálico liberado

A cada cinco minutos (até completar os 30 minutos) devem ser retiradas alíquotas de 0,4 mL da mistura reacional, transferi-las para os tubos de ensaio, que deverão estar preparados com 0,6 mL de solução etanólica de rodanina, e homogeneizar vigorosamente.

Após retirar a última alíquota, deixar reagir por cinco minutos. Em seguida, adicionar 0,4 mL da solução de hidróxido de potássio 0,5 N em cada tubo homogeneizar e deixar em repouso por 2,5 minutos. Logo após esse tempo, adicionar 8,6 mL de água destilada, homogeneizar vigorosamente e ler em espectrofotômetro a 520 nm.

Etapa III: Cálculo da atividade presente no derivado imobilizado

A partir dos valores experimentalmente obtidos (Tabela 1), plotar, em planilha ou calculadora científica, a absorvância no eixo Y contra o tempo (em minutos) no eixo X. Em seguida, determina-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2), onde esse último deve apresentar um valor acima de 0,95 (Fig. 2).

Tabela 2. Exemplo de valores experimentais obtidos para a análise de atividade imobilizada.

Tempo (minutos)	Absorvância 1	Absorvância 2
0	0,2373	0,2329
5	0,3145	0,3197
10	0,4034	0,4167
15	0,4929	0,5089
20	0,6065	0,5920
25	0,6877	0,6673
30	0,7608	0,7768

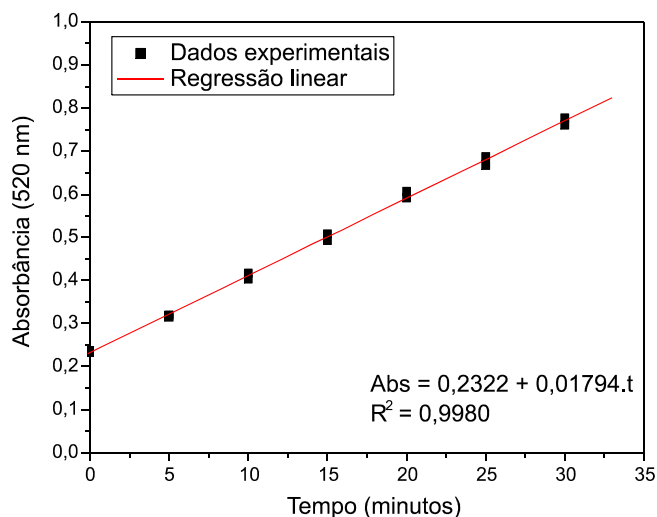


Fig. 2. Modelo de gráfico para cálculo da atividade da enzima.

O cálculo de atividade do derivado é descrito na Equação 2.

$$Ativ = \frac{Coef * fator}{170,1 * massa} \quad (Eq. 2)$$

Ativ. → Atividade do derivado imobilizado (U/g)

Coef. → Coeficiente angular

fator → Fator de conversão da curva padrão de ácido gálico (mg/L)

170,1 → Peso molecular do ácido gálico (u.m.a.)

massa → massa do derivado

Etapa IV: Determinação do rendimento de imobilização e da atividade recuperada

A partir da Equação 3, podemos determinar o rendimento da imobilização, ou seja, o percentual de enzima que foi ligada covalentemente ao suporte.

$$Rend = \frac{(Ativ_{inicial} - Ativ_{final})}{Ativ_{inicial}} \times 100 \quad (Eq. 3)$$

Rend. → Rendimento de imobilização

Ativ._{inicial} → Atividade livre inicial (U/mL)

Ativ._{final} → Atividade livre final (U/mL)

Depois de determinar a atividade do derivado na etapa anterior, com o auxílio da Equação 4 é possível determinar a atividade recuperada da enzima no derivado.

(Eq. 4)

$$Ativ_{recuperada} = \frac{Ativ_{derivado} \cdot x_{massa}}{(Ativ_{inicial} - Ativ_{final}) \cdot x_{volume_{imobilização}}} \times 100$$

Ativ._{Recuperada} → Atividade recuperada do derivado imobilizado

massa → massa do derivado imobilizado (g)

Ativ._{inicial} → Atividade livre inicial (U/mL)

Ativ._{final} → Atividade livre final (U/mL)

Volume_{imobilização} → volume do meio reacional

Referências Bibliográficas

CHIBATA, I. Industrial application of immobilized enzyme-systems. **Pure and Applied Chemistry**. v.50, n.7, p.667-675, 1978.

SHARMA, S., BHAT, T.K.; DAWRA, R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**. v. 279, p. 85-89, 2000.

SKENE, I.D.; BROOKER, J.D. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Anaerobe**, v.1, n.6, p. 321-327, 1995.

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.

THIES, M.; FISCHER, R. Photometrische bestimmung von gallassäuredurch farbreaktion mit rhodanine. **Mikrochimica Acta**, v.5, p.809-814, 1973.

Comunicado Técnico, 110



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@cpnat.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.

