

Utilização do produto "A" como adjuvante ao processo de secagem do extrato bruto enzimático

Nayara Kelly Ribeiro Silva^a, Loreny Ribeiro do Nascimento^b, Edemilson Cardoso da Conceição^c, Mariângela Fontes Santiago^c, Telma Alves Garcia^d
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74605-220, Brasil
E-mail: nayarakellyr@hotmail.com; telma@farmacia.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: secagem; extrato bruto; produto A

1. INTRODUÇÃO

Pycnoporus sanguineus é um fungo conhecido popularmente como orelha-de-pau, podendo ser encontrados em madeiras, onde se fixam e se alimentam. É chamado de fungo de decomposição branca, e produz enzimas lignolíticas, capazes de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos (TEIXEIRA *et al.*, 1997). Esse complexo enzimático pode oxidar uma série de compostos fenólicos relacionados à lignina e o uso de mediadores adequados pode possibilitar a oxidação de compostos não-fenólicos (BORBONNAIS & PAICE, 1990).

Enzimas industriais são frequentemente submetidas a processos de secagem, pois facilita o manuseio do produto e a estabilidade de um produto em pó é melhor que em uma formulação líquida (SLOTH; BACH; JENSEN; KIIL, 2007). A retirada de água reduz a liberdade de circulação das moléculas de proteína e, portanto, inibe mudanças conformacionais que levam à perda da atividade enzimática (MONSAN; COMBES, 1984). A escolha de um método adequado de secagem que preserve a atividade enzimática original e que seja economicamente viável tem sido o foco de várias pesquisas (JESUS, 2002).

^a Orientanda

^b Aluna IC da Faculdade de Farmácia

^c Professores da Faculdade de Farmácia

^d Orientadora; professora da Faculdade de Farmácia

2. OBJETIVO

Nesse trabalho, avaliou-se a influência do produto A no processo de secagem do extrato bruto enzimático, através da determinação de sua atividade antes, logo após o processo de secagem e durante a estocagem.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo do Organismo

O fungo *P. sanguineus*, foi obtido junto à Fundação André Tosello, Campinas/SP, cultivado em em Ágar Batata Dextrose (BDA), protegido da luz, à temperatura de 28°C e mantido sob refrigeração. Para obtenção do extrato enzimático o micro-organismo foi inoculado em meio líquido e mantido sob agitação constante de 140 rpm por 8 dias. Após esse período o material foi filtrado e utilizado nos experimentos de secagem.

3.2 Obtenção do extrato seco a partir do extrato bruto enzimático

A secagem do extrato bruto foi realizada utilizando um equipamento apropriado. Foram realizados quatro experimentos, sendo utilizado o produto A como adjuvante em concentrações e tempos de incorporação diferentes, a fim de se obter extratos secos com características físicas e químicas aceitáveis. As condições de secagem foram iguais para todos os experimentos e os extratos obtidos foram recolhidos imediatamente, acondicionados em recipientes com barreira para a umidade e estocados sob refrigeração.

3.3 Determinação da atividade do produto Y

A atividade da enzima foi determinada no extrato bruto no estado líquido e desidratado, utilizando-se substrato apropriado. A mistura de reação continha tampão acetato de sódio, extrato bruto contendo a enzima e substrato, em volume final de 1 mL. O extrato seco obtido através de processo de secagem foi ressuspenso em quantidade suficiente de tampão acetato de sódio. Foi feita a determinação da absorbância utilizando um espectrofotômetro e a atividade foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados quatro experimentos distintos nos quais houve variação na concentração do adjuvante e no tempo de incorporação do mesmo, conforme detalhado na tabela 1, sendo que A1 é menor que A2 e tempo 1 é menor que o tempo 2.

Tabela 1- Detalhamento dos experimentos realizados

| Parâmetro | Concentração do adjuvante | Tempo de incorporação |
|----------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Experimento 1 | A1 | 1 |
| Experimento 2 | A1 | 2 |
| Experimento 3 | A2 | 1 |
| Experimento 4 | A2 | 2 |

Inicialmente avaliou-se para todos os experimentos o efeito do processo de secagem na atividade da enzima presente no extrato bruto, comparando-se a atividade da mesma no extrato no estado líquido e imediatamente após a secagem, sendo a primeira considerada como controle (Tabela 2).

Tabela 2- Efeito do processo de secagem na atividade enzimática do extrato bruto

| Experimentos | Atividade relativa (%) |
|---------------------|-------------------------------|
| Controle | 100 |
| Experimento 1 | 61,8 |
| Experimento 2 | 41,9 |
| Experimento 3 | 125 |
| Experimento 4 | 42,9 |

Os dados obtidos logo após a secagem do extrato mostraram que a maior concentração do adjuvante conferiu à enzima em questão um efeito protetor de sua atividade, enquanto que um maior tempo de incorporação resultou em maior perda da atividade

enzimática. Essa perda inicial de atividade na maioria dos experimentos era esperada em função do processo de secagem utilizado, já que após a desidratação a enzima sofre mudanças conformacionais, que pode resultar na perda de atividade (PRESTRELSKI *et al.*, 1993). Outros fatores que podem ter provocado queda da atividade enzimática da maioria dos experimentos foi a temperatura de secagem utilizada nos experimentos, indicando a necessidade de uma adequação dos parâmetros utilizados para uma melhor manutenção da atividade enzimática. De forma contrária ao efeito da temperatura, a utilização de adjuvantes é feita com o objetivo de colaborar para a manutenção da estrutura, evitando uma maior perda de atividade, sendo que alguns podem até mesmo aumentar a atividade do produto, como ocorrido no experimento 3.

A secagem de produtos facilita operações como armazenamento, transporte e às vezes até mesmo seu manuseio, mas é de extrema importância que a enzima após secagem seja capaz de manter uma atividade satisfatória. Com esse objetivo fez-se então um acompanhamento do extrato após secagem, nas quatro condições distintas já mencionadas.

Na figura 1 são apresentados os dados da estabilidade dos extratos secos, durante o período de armazenamento considerado. Analisando a conservação da atividade após a secagem nas diferentes condições do processo vê-se que as amostras apresentaram um aumento da atividade até o 20º dia, seguida de uma redução da mesma para amostras dos experimentos 1 e 4 enquanto que as amostras dos experimentos 2 e 3 tiveram a atividade praticamente mantida até o 30º dia do estudo.

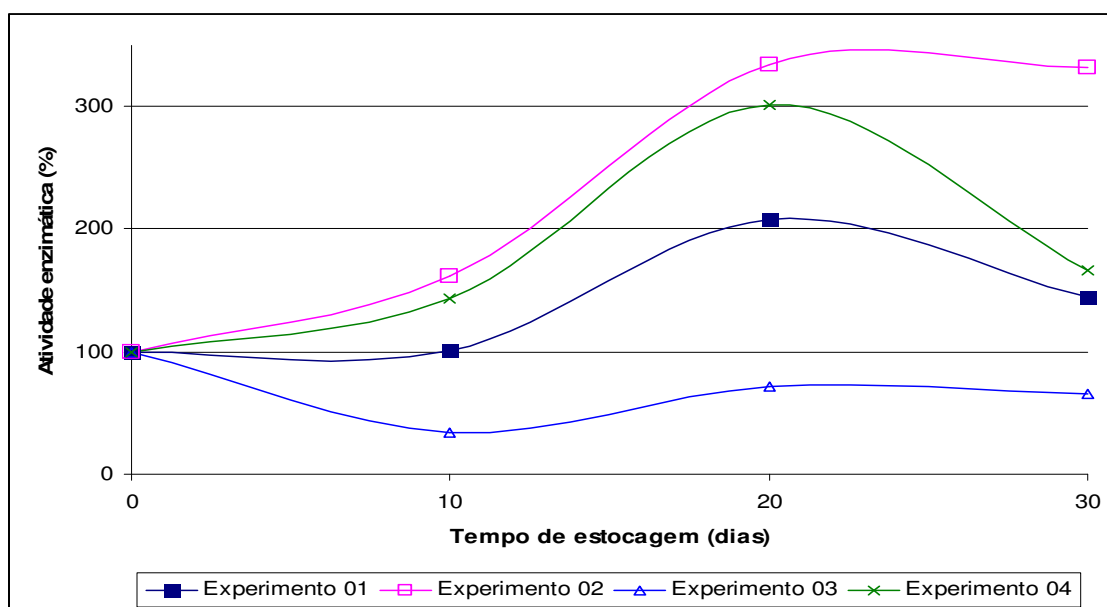


Figura 1 - Estabilidade durante o armazenamento do extrato bruto dessecado

Comparando-se a atividade do extrato bruto dessecado ao final do período de estocagem com a atividade do extrato bruto no estado inicial observou-se que uma atividade de 90%, 140%, 82% e 72% resultante dos experimentos 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Em trabalhos anteriores realizados por este grupo, utilizando outros adjuvantes, não se observou efeito semelhante.

Um dos parâmetros importantes no processo de secagem é o tempo de incorporação do adjuvante, por isso avaliou-se o efeito deste tempo logo após a secagem e ao longo do período de armazenamento. Nos blocos de experimentos em que se utilizou a mesma concentração de adjuvante constatou-se que, de maneira geral, a incorporação por um tempo menor (experimentos 1 e 3) resultou em melhor atividade da enzima, isso imediatamente após a secagem. No entanto, a partir do décimo dia houve uma inversão desse comportamento, sendo que os experimentos que tiveram um maior tempo de incorporação passaram a ter uma maior atividade enzimática, exceto para os experimentos 3 e 4 que no 30º dia voltaram a apresentar comportamento contrário, embora com atividade bastante parecidas (Fig. 2).

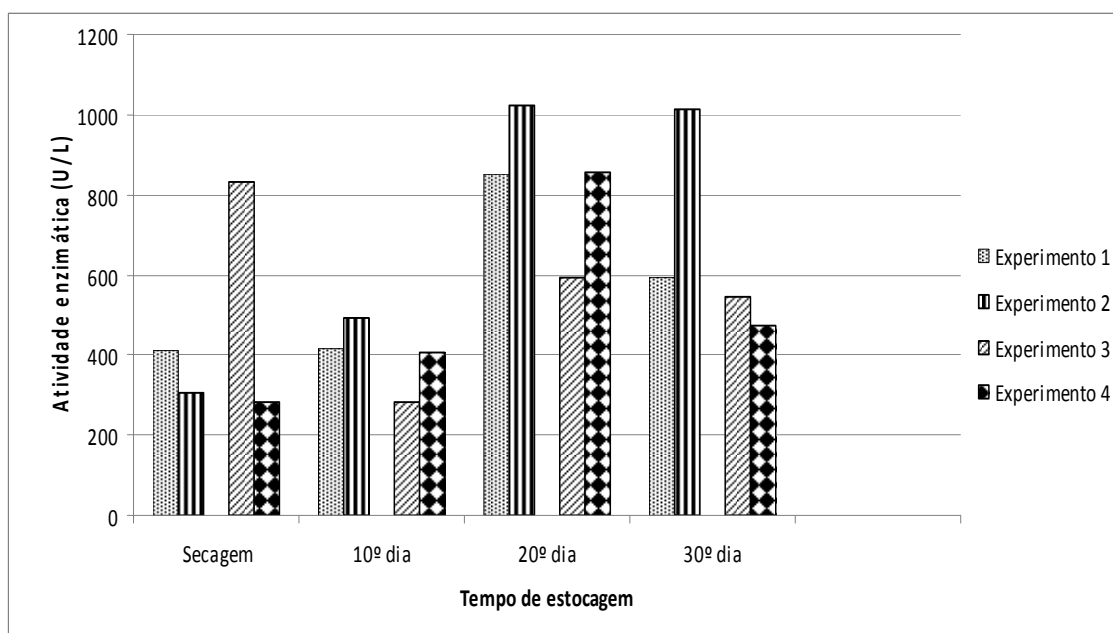


Figura 2 - Efeito do tempo de incorporação do adjuvante na estabilidade da enzima durante sua estocagem. Experimentos 1 e 3 tempo de incorporação 1; experimentos 2 e 4 tempo de incorporação 2.

O efeito da concentração do adjuvante sobre a atividade da enzima foi outro aspecto avaliado neste estudo. Observa-se que para os grupos de experimentos em que o tempo de incorporação foi o mesmo, tempo 1 para experimentos 1 e 3 e tempo 2 para experimentos 2 e 4, uma concentração maior de adjuvante levou a uma melhor conservação da atividade nos experimentos com tempo 1, já os experimentos que tiveram o tempo de incorporação 2 permaneceram praticamente com a mesma atividade, isso imediatamente após a secagem (Fig. 3).

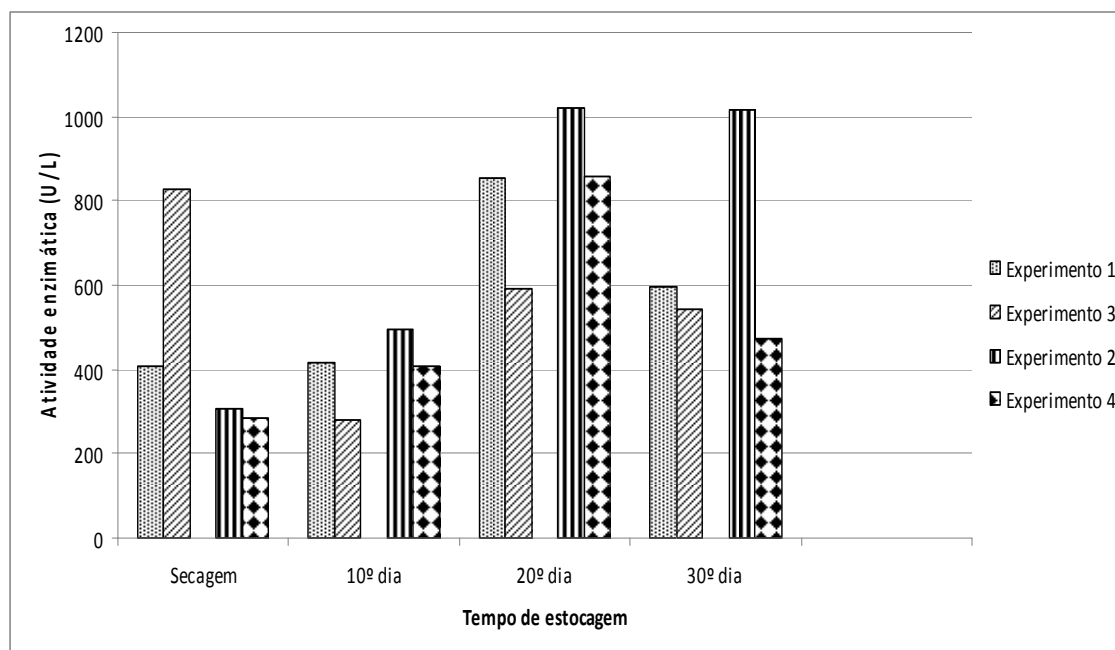


Figura 3 - Efeito da concentração do adjuvante na estabilidade da enzima durante sua estocagem. Experimentos 1 e 2 concentração de adjuvante A1; experimentos 3 e 4 concentração de adjuvante A2.

Essa melhor conservação da atividade no experimento com uma maior concentração do adjuvante está em consonância com o observado em outro estudo relativo a processos de secagem (VASILJEVIC; JELEN, 2003). Durante a estocagem verificou-se que a amostra resultante do experimento 3 que havia apresentado aumento de atividade logo após a secagem sofreu uma queda acentuada de atividade (66%) nos 10 primeiros dias de armazenamento enquanto que para as demais amostras neste mesmo período houve aumento ou manutenção da atividade. Em todos os experimentos a atividade praticamente duplicou entre o 10º e o 20º

dia de armazenamento. Após 30 dias de estocagem houve uma redução da atividade das amostras dos experimentos 1, 3 e 4 enquanto que a amostra submetida ao experimento 2 foi a que apresentou o melhor resultado, com manutenção da atividade observada no 20º dia sendo esta 40% maior que a atividade do extrato antes da secagem. É interessante ressaltar que ao longo de todo o armazenamento a atividade enzimática foi maior nas amostras com menor concentração de adjuvante, o que é importante quando se avalia o aspecto da viabilidade econômica, principalmente quando se objetiva uma aplicação em larga escala para o processo.

7 CONCLUSÃO

Considerando-se os dados obtidos até o momento, pode-se afirmar que o protocolo de experimentação 2 no qual foi utilizado a concentração A1 de adjuvante e tempo 1 de incorporação, apesar de ter levado a uma maior perda inicial de atividade enzimática, foi o que apresentou o melhor resultado, sendo capaz de levar a uma recuperação e até superação da atividade inicial durante o período de armazenamento. Novos experimentos devem ser realizados a fim de melhorar as características do pó e minimizar a perda inicial da atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, 267: 99 – 102, 1990.

JESUS, S. S. **Desenvolvimento e Análise do Processo de Secagem de α -Amilase por microondas à vácuo**. 2002. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Processos Químicos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2002.

MONSAN, P; COMBES, D. Effect of water activity on enzyme action and stability. **Enzyme Engineering**, 7: 48 - 60, 1984

PRESTRELSKI, S. J., TEDESCHI, N., ARAKAWA, T., CARPENTERT, J. F. Dehydration-induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers. **Biophysical Journal**, 65: 661-671, 1993.

SLOTH, J; BACH,P; JENSEN, A; KIIL, S. Evaluation method for the drying performance of enzyme containing formulations. **Biochemical Engineering Journal**, 40 (1): 121 – 129, 2008.

TEIXEIRA, D. E.; COSTA, A. F.; SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. **Scientia Forestalis**. 52: 29-34, 1997.

VASILJEVIC, T; JELEN, P. Drying and storage of crude b-galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 4: 319–329, 2003