

ESTUDO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA TANINOS HIDROLISÁVEIS

ARIANA FARIAS MELO* (arianafmelo@hotmail.com); Andréa Medeiros SALGADO (andrea@eq.ufrj.br), Departamento de Engenharia Bioquímica – Escola de Química, Universidade do Rio de Janeiro -CT- Bloco E – Rio de Janeiro – RJ
Gustavo Adolfo Saavedra PINTO (gustavo@cnpq.embrapa.br), Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza – CE

ABSTRACT

The development of biosensors is growing, it allows the measurement of the analyte of interest is achieved by transduction of a selective parameter of the reaction biocomponente-analyte in an electric signal that can be monitored. For this reason, the biological factor that makes up the instrument, it is an essential component for its construction. With that the aim of this work was the study of a process of immobilization of the enzyme tannase in support vitreous, the determination of their conditions of work and their optimal efficiency when applied to a proper system of transduction for the construction of a biosensor for hydrolysable tannins.

Key-words: Tannin, Determination, Tannase, Biosensor.

1 – INTRODUÇÃO

Existem atualmente na literatura, vários métodos para determinação de taninos hidrolisáveis, entretanto cada um apresenta restrições de aplicação, principalmente no que se diz respeito a sua aplicação em amostras reais (MUELLER-HARVEY, 2001). ZHAE *et al.*, (1998) desenvolveram um sensor microbiano para determinação de ácido tânico, baseando-se na variação de oxigênio gerada pela degradação do composto orgânico (ácido tânico) pelo microrganismo. Comparando a proposta do sensor para ácido tânico com outros biossensores, este representa uma nova abordagem conveniente e de baixo custo para a quantificação dos taninos vegetais, porém são necessárias algumas melhorias para torná-lo amplamente aceito na indústria de curtumes de produtos alimentícios e farmacêutica. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o melhor método de transdução a ser utilizado no desenvolvimento biossensor enzimático para que este possa ser aplicado no futuro na monitoração de taninos hidrolisáveis.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

A enzima tanase foi adquirida a partir do produto comercial Biopectinase CT, gentilmente doada pela Quest International, produzida por *Aspergillus niger*, batelada 502051. O suporte utilizado para o processo de imobilização no presente trabalho foi pérolas de vidro aminopropil da Sigma (tamanho de poro de 700 Å/ 80-120 mesh).

Baseado no produto da reação enzimática da tanase sobre o substrato foi realizada a seleção de dois transdutores a serem avaliados: O primeiro um eletrodo de pH (marca *Actron*) acoplado a um pHmetro e o segundo um colorímetro com comprimento de onda fixo em 490nm.

Para verificar a variação de pH na solução de ácido tânico pela ação da enzima tanase, foram realizados testes estáticos com a enzima livre e imobilizada em contato com a solução de ácido tânico preparada com água destilada variando as concentrações de 10 a 100mg/L, na temperatura de 25°C por 5 minutos para a tanase livre, e 15 minutos para a tanase imobilizada. A fim de avaliar a possível utilização de um colorímetro, foram realizados ensaios com a enzima imobilizada em contato com a solução de ácido tânico preparada com tampão acetato 20 mM pH 5,0 variando as concentrações de 50 a 500 mg/L, na temperatura de 50°C por 15 minutos. Os ensaios foram realizados, de modo que as soluções de ácido tânico fossem testadas em ordem crescente e decrescente em valores de concentração, e ainda com e sem lavagem da enzima imobilizada e do eletrodo de pH com água destilada no volume de 300 mL durante as medidas. A cada nova concentração testada a variação de pH (ΔpH) e de absorbância (ΔAbs) foram registrados através do produto obtido da reação enzimática.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na seleção inicial do transdutor foi escolhido o sistema eletrodo de pH com pHmetro. A partir da Figura 1.1 é possível observar que até uma concentração de 50mg/L de ácido tânico foi possível obter uma linearidade na resposta da variação do pH em relação a atividade da enzima em função da formação do produto (ácido gálico).

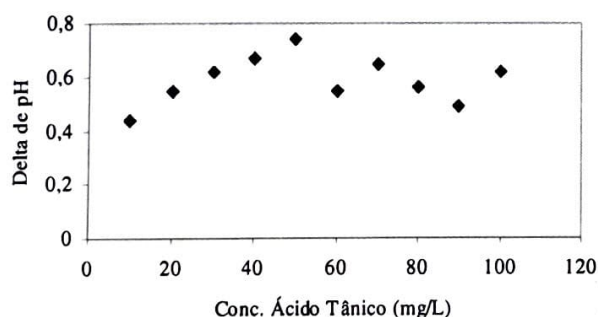


Figura 1.1: Curva de resposta para o transdutor (eletrodo de pH) a partir de reações da tanase livre.

Para a IUPAC só é considerado um biossensor aquele instrumento que apresenta na sua construção o componente biológico em contato diretamente com elemento transdutor (THEVENOT *et al*, 2001) Assim foram realizados testes com o sistema eletrodo de pH e a tanase imobilizada. A partir da Figura 1.2a é possível verificar que não existe uma resposta linear, bem como uma estabilidade e repetibilidade dos dados obtidos em todas as ordens

testadas, de forma que não seria possível utilizar o eletrodo de pH como transdutor do biossensor.

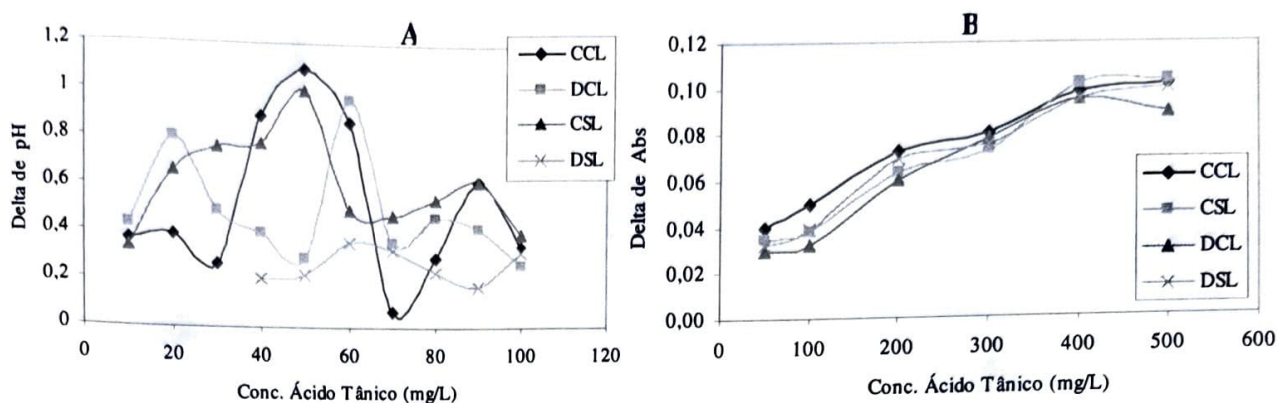


Figura 1.2: Curva de resposta para o sistema transdutor (eletrodo de pH) e a enzima imobilizada (A) e colorímetro e tanase imobilizada (B). CCL = crescente com lavagem; CSL = crescente sem lavagem; DCL = decrescente com lavagem; DSL = decrescente sem lavagem.

Em seguida em função dos resultados insatisfatórios obtidos com o sistema de transdução inicial, um novo transdutor foi testado um colorímetro, tendo este comprimento de onda fixo em 490 nm. Ao analisar a linearidade das curvas apresentadas na Figura 1.2b pode-se observar que independente das condições dos testes, todas as curvas apresentaram uma boa linearidade do sistema testado, portanto sua elevada sensibilidade.

4 - CONCLUSÃO

Desta forma podemos concluir que na construção do biossensor enzimático para taninos o sistema detector colorimétrico a 490 nm mais enzima tanase imobilizada em pérola de vidro podem ser usadas e aplicadas para a quantificação do ácido tânico na concentração de 50 a 500 mg/L, na temperatura de 50°C, pH 5,0 e com 15 minutos de reação.

5 - REFERÊNCIAS

- ZHAE, Y.B.; WEN, M.L.; LIU, S.Q.; LIU, Z.H.; ZHANG, W.D.; YAO, Y.; WANG, C.Y.; Microbiologi Sensor for determination of Tannic Acid, *Microchemical J.*, v. 60, p. 201-209; 1998.
- MUELLER-HARVEY, I. Analsis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, v. 91, p. 3-20, 2001.
- THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A; WILSON, G.S.; Electrochemical biosensor: recommended definition and classification, *Biosensor & Bioelectronics*, v. 16, p. 121-131; 2001.