



IND-44 IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLISILOXANO REVESTIDAS COM POLIANILINA

Débora P. B. Bernardino¹, David F. Neri², Luiz B. Carvalho-Júnior^{1,3}.

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal. ³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

lbcj@hotmail.com.br

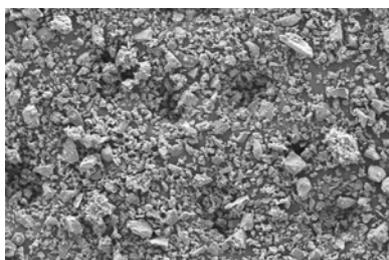
INTRODUÇÃO: Os humanos são os únicos mamíferos que fazem uso de leites e seus derivados como alimentos após o desmame. Nesta capacidade é essencial a atuação da β -galactosidase, enzima situada na membrana plasmática de seus enterócitos, na conversão da lactose, principal carboidrato do leite, em glicose e galactose. Todavia, a deficiência ou mesmo ausência desta enzima é comum na população humana. Decorre desta insuficiência a permanência deste dissacarídeo no lúmen do intestino, susceptível à ação de bactérias que irão fermentá-lo, promovendo a liberação de gases e de compostos que aumentam os movimentos peristálticos, causando diarreia e desconforto. Para contornar este problema têm surgido produtos lácteos com baixos teores de lactose obtidos mediante seu tratamento prévio com β -galactosidase. Atualmente, esses derivados ainda são caros por conta do uso de enzima solúvel. O emprego de β -galactosidase imobilizada pode vir a baratear o custo de produção de leites e derivados com baixo teor de lactose, em face do reuso da enzima imobilizada e de sua maior termoestabilidade. A imobilização de enzimas tem sido uma linha de investigação do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica e do Setor de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ambos da Universidade Federal de Pernambuco. Diversos suportes têm sido recentemente propostos para imobilização de várias proteínas, tais como, Dacron (Coelho *et alii*, 2001; Amaral *et alii*, 2006), pérolas de compósito de polisiloxano com álcool polivinílico (Coelho *et alii*, 2002, 2003). Este trabalho tem como objetivo imobilizar β -galactosidase em partículas magnéticas de polisiloxano revestidas com polianilina (mPOS-PANI), bem como investigar suas propriedades com vistas ao seu emprego na redução dos níveis de lactose no leite.

MATERIAIS E MÉTODOS: *Materiais:* β -galactosidase de *Aspergillus Oryzae* foi obtida de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Tetraortossilicato, FeCl_3 e MgCl_2 , foram adquiridos de Fluka (Steinheim, Germany); FeCl_2 e o-nitrofenol (ONP) de Riedel de Haën (Steinheim, Germany); glutaraldeído e o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) e albumina de soro bovino de Pierce (Rockford, United States). Todos os demais compostos químicos foram de grau analítico. *Metodologia:* *Síntese e Magnetização do POS:* Etanol (5 ml) e tetraetilortossilicato (5 ml) foram misturados. Elevou-se a temperatura para 70°C, sob agitação, e 1M HCl (150 μ l) foi adicionado. Depois de 50 min, a solução foi distribuída em microplacas de ELISA (200 μ l/poço) e deixou-se solidificar por volta de 48h a 25°C. As contas foram maceradas e as partículas foram suspensas em água destilada (100 ml) e 10 ml de 0,6M FeCl_2 e 1,1M FeCl_3 foram adicionados, sob agitação. O pH foi ajustado para 11 com hidróxido de amônio (NH_4OH). Depois de 30 min a 100°C, sob agitação, as partículas magnetizadas foram lavadas com água destilada até chegar ao pH 7,0 e secas em estufa a 50°C. *Revestimento com Polianilina:* O suporte POS magnetizado (2,5 g) foi tratado com uma solução (10 mL) de KMnO_4 por 18 h, sobre agitação a 50 °C. O suporte foi lavado com água e mergulhado em uma solução (10 mL) de anilina 0,5 M, preparada em HNO_2 1 M, deixado a agitar por 2h a temperatura ambiente, para permitir a polimerização. O Suporte foi novamente lavado com água, ácido cítrico 0,1 M e água e colocado para secar numa estufa a 105 °C. *Ativação das partículas mPOS-PANI com glutaraldeído:* Partículas magnéticas (50 mg) foram incubadas com 2,5% (p/v) de glutaraldeído (50 μ l) em 450 μ l de 1M H_2SO_4 sob suave agitação por 2h a 25°C. Depois as partículas foram enxaguadas 5 vezes com NaCl 1M e mais 5 vezes com tampão de reação, usando campo magnético (6000 Oe) para recuperar as partículas tratadas. *Imobilização da β -galactosidase em mPOS-PANI:* Partículas magnéticas de POS-PANI-glutaraldeído (50 mg) foram incubadas com preparação de β -galactosidase por 24h a 4° C. As partículas foram coletadas sob um campo magnético e o sobrenadante usado para a determinação



da proteína. *Hidrólise da Lactose pela β -galactosidase imobilizada em mPOS-PANI*: Dez eppendorfs cada um com 1 mL de leite magro foram incubados com β -galactosidase imobilizada no mPOS-PANI (10 mg) a 25 °C em agitação orbital (20 rpm). Em determinados intervalos de tempo o meio reacional foi separado do suporte com ajuda de um campo magnético, aquecido a 100 °C por 10 min e filtrado com filtros de seringa de 0,2 mm (para eliminar alguma eventual partícula magnética presente no meio). Os açúcares presentes no meio (glucose, galactose e lactose) foram quantificados através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: *Caracterização estrutural do mPOS-PANI*: Imobilização da β -galactosidase foi realizada em vários suportes: IMAC; sílica de alumina, tiopropilagarose, celulose, gelatina, magnético poli (GMAMMA), MANAE e PEI, POS-PVA magnetizado, fibras de alginato-gelatina, celite e pérolas de celulose, envolvendo adsorção física, ligação covalente, reação cruzada e enclausuramento. As partículas magnetizadas de polisiloxano revestidas com polianina (mPOS-PANI) foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (figura abaixo), apresentando forma romboédrica e, quanto ao tamanho, variaram de 15 a 100 μ m.



Reutilização do mPOS-PANI e hidrólise da lactose do leite: Estes dados serão apresentados graficamente no poster.

CONCLUSÕES: As partículas magnéticas de polisiloxano revestidas com polianina têm se mostrado um suporte atrativo para a imobilização da β -galactosidase devido à simplicidade de sua síntese e, acima de tudo, à fácil remoção do meio de reação por meio da simples aplicação de um campo magnético no reator.

AGRADECIMENTOS: Os autores são gratos a: PIBIC/ UFPE/ CNPq.

REFERÊNCIAS

Amaral, I.P.G.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Carvalho Jr., L.B.; Bezerra, R.S. 2006. *Process Biochem.* 41: 1213-1216.

Coelho, R.A.L.; Yamasaki, H.; Perez, E.P.; Carvalho Jr., L.B. 2003. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 98: 391-393.

Coelho, R.A.L.; Jaques, G.A.; Barbosa, A.D.; Velásquez, G.; Montenegro, S.M.L.; Azevedo, W.M.; Carvalho Jr., L.B. 2002. *Biotechnol. Lett.* 24: 1704-1708.

Coelho, R.A.L.; Santos, G.M.P.; Azevedo, P.H.S.; Jaques, G.A.; Azevedo, W.M.; Carvalho Jr., L.B. 2001. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 56: 257-260.

Bayramoglu, G.; Tunali, Y.; Arica, M. Y. 2007. *Catalysis Communications.* 8: 1094-1101.

Tanriseven, A.; Dogan, S. 2002. *Process Biochem.* 38: 27-30.

Gaur, R.; Pant, H.; Jain, R.; Khare, S.K. 2006. *Food Chem.* 97: 426-430.