

PURIFICAÇÃO DE POLIFENOLOXIDASE DE RESÍDUO VITIVINÍCOLA POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA

Cleber Klasener da Silva

Acadêmico do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa.
cleber.klasener@yahoo.com

Ana Paula Manera

Professor/Pesquisador do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa.
caroline.moraes@unipampa.edu.br

Caroline Costa Moraes

Professor/Pesquisador do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa.

Resumo. Nos dias atuais, a utilização de subprodutos industriais se faz de grande interesse devido à alta geração de resíduos, como é o caso das indústrias do vinho, onde é gerada grande quantidade de bagaços, engaços e borras. Dentre os compostos presentes nos resíduos dessas indústrias encontra-se a enzima polifenoloxidase (PFO). Para que essa enzima possa ser utilizada, ela precisa ser extraída e, em determinados casos, purificada. O presente projeto teve como objetivo extrair e purificar polifenoloxidase dos subprodutos da indústria de vinho. Utilizando métodos cromatográficos para a purificação da PFO, o pH de melhor adsorção foi de 6,5, e obteve-se uma recuperação de 7,5% nessas condições.

Palavras-chave: Polifenoloxidase. Purificação. Resíduo.

1. INTRODUÇÃO

O aproveitamento dos resíduos industriais visando reduzir o impacto ambiental é um tema que vem ganhando a atenção de muitos pesquisadores no Brasil e no mundo nas últimas décadas. Nesse sentido, a obtenção de enzimas e outros compostos de interesse comercial a partir de rejeitos se torna uma ótima alternativa. A região onde está inserida a UNIPAMPA é

grande produtora de vinhos, uma vez que hoje a região da Campanha Gaúcha tem recebido grande atenção e investimentos devido ao seu alto potencial para a vitivinicultura, em função dos seus atributos edafo-climáticos. Segundo a Associação de “Vinhos da Campanha” atualmente, a região abriga 16 vinícolas. São 1,3 mil hectares plantados em nove municípios por 150 produtores. Considerando estes dados, percebe-se que há muita geração de resíduos como casca, engaços e borras, que hoje são destinados a adubação ou alimentação de alguns animais.

Dentre os compostos presentes nos resíduos da indústria do vinho encontra-se a polifenoloxidase (PFO), que é uma enzima responsável pela oxidação de compostos fenólicos, os quais, na presença de O₂, os transformam em quinonas coloridas que participam, posteriormente, das reações de polimerização para dar origem às melonoidinas, caracterizadas pelo aparecimento de cor escura (KOBBLITZ, 2008).

Polifenoloxidases são enzimas que contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e, a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas. As

polifenoloxidasas atuam sobre uma grande variedade de substratos. Cita-se p-cresol, tirosina e ácido p-cumárico como substratos monofenólicos, enquanto catecol, dihidroxifenilalanina e ácido clorogênico substratos difenólicos (GOMES et al., 2001)

O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos e também no tratamento de solos e efluentes diversos. Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos, uma vez que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos (CONCEIÇÃO et al., 2005). A degradação de compostos fenólicos tem uma estreita relação com a decomposição da lignina. A produção de enzimas do grupamento polifenoloxidase é de extrema importância biotecnológica, pois são enzimas responsáveis pela quebra da lignina e de polímeros complexos como efluentes industriais e hidrocarbonetos do petróleo.

Além da degradação dos compostos fenólicos, as polifenoloxidasas apresentam outra função com importância na indústria biotecnológica, que seria a sua atuação como mecanismo de defesa contra a ação de patógenos e pragas (MELO, 2005).

Outra utilização para a polifenoloxidase é descrita por Perone (2009), onde esta é utilizada na construção de biossensor para a determinação de compostos fenólicos em alimentos.

Para que essa enzima possa ser utilizada, ela precisa ser extraída e em alguns casos purificada. Evidenciado pelos fatos citados acima, e complementado pela presença de uma grande quantidade de vinícolas na região, a extração da PFO vem ao encontro das necessidades atuais, onde é preciso aproveitar mais a matéria processada, para que menos resíduos sejam depositados no meio ambiente. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo extrair

e purificar polifenoloxidase dos subprodutos da indústria de vinho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção dos extratos enzimáticos, os diferentes subprodutos foram homogeneizados com solução tampão fosfato de sódio 100 mM. Durante a extração foram acrescentados polivinilpirrolidona (PVPP) 1% p/v para inibição de compostos fenólicos e traços de CaCl_2 para inibição da ação da pectina. A solução foi então filtrada com tecido de algodão e recolhida em banho de gelo.

Após a extração foi feita a medida da atividade enzimática através do método espectrofotométrico descrito por LIMA et al. (2001), onde mistura-se a amostra com o substrato catecol em tampão fosfato de potássio. A atividade da enzima foi calculada pela inclinação linear da curva. Uma unidade de atividade de PFO é definida como a quantidade da enzima que ocasiona um aumento na absorbância de 0,001/min/mL. O tempo de reação utilizado foi de 2 minutos. Para o branco foi usado a mistura de solução tampão mais solução do substrato.

Para a purificação da enzima foram utilizadas técnicas cromatográficas. Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas.

A cromatografia líquida é o mais importante método de purificação para substâncias biológicas quando são requeridas altas resoluções. Sua versatilidade e flexibilidade são insuperáveis. A característica molecular mais comumente explorada em separações são o tamanho, as propriedades iônicas e hidrofóbicas bem como certas interações bioespecíficas.

Para a purificação através da cromatografia de troca iônica, foram testados 2 adsorventes, QAE Sephadex A25 e Q

Sepharose Fast Flow , ambos da GE Healthcare LifeSciences.

Inicialmente foram realizados testes de adsorção em diferentes pHs. Nestes ensaios, realizados sempre em triplicata, o extrato bruto enzimático extraído das cascas de uvas era ajustado no pH de estudo, que foi entre 5,0 a 8,0, variando a cada 0,5. A seguir, foi retirada uma amostra para avaliação da atividade enzimática, e imediatamente foi adicionado a resina (QAE Sephadex ou Q Sepharose FF) na proporção de 1:10, e colocadas em mesa agitadora por 60 min a 120 rpm. Após atingir o equilíbrio, uma amostra foi novamente retirada de cada frasco para nova medida de atividade. A quantidade adsorvida na resina foi calculada pela diferença entre a atividade inicial, descontada do branco (ensaio onde não foi adicionado resina) para cada pH e a atividade final, para cada pH. Foi possível assim estabelecer qual melhor pH para adsorção de PFO em cada uma das resinas testadas.

Após a determinação do pH de adsorção, uma coluna cromatográfica C10/20 foi preenchida com 10 cm de leito de resina e a seguir, equilibrada com tampão fosfato de potássio 25 mM, no pH de adsorção. A seguir, alimentou-se a coluna com extrato enzimático previamente purificado através de precipitação com etanol, no pH de trabalho, em fluxo descendente. Depois da lavagem com tampão fosfato para retirada das proteínas não adsorvidas, procedeu-se com a eluição, realizada em gradiente salino, de 0-1M em 50 mL de cloreto de sódio em tampão fosfato 25 mM, também em fluxo descendente. A cada 3 mL foi coletado uma fração, na qual foi feita leitura de proteínas totais a 280 nm e medida da atividade enzimática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para avaliar a adsorção da enzima bruta nas duas resinas de troca iônica, foram

realizados testes de adsorção em reatores erlenmeyers, contendo o extrato enzimático no pH de trabalho e a resina, previamente equilibrada no pH de estudo. Os resultados obtidos nestes experimentos podem ser observados na Figura 1.

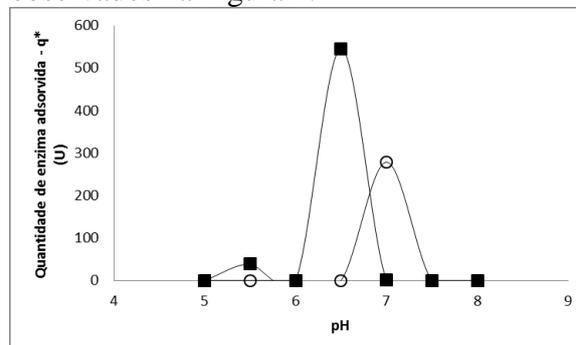


Figura 1: Variação da quantidade de PFO adsorvida na resina de troca iônica Q Sepharose FF (■) e QAE Sephadex (○) nos diferentes pHs.

É possível observar que só houve adsorção de PFO no pH 7,0, quando utilizada a resina QAE Sephadex e pH 6,5, quando na resina Q Sepharose FF, sendo neste caso, a adsorção mais efetiva. Desta forma, optou-se por realizar a cromatografia de troca iônica utilizando a resina Q Sepharose FF, com equilíbrio em pH 6,5.

Na realização da purificação em leito fixo, foi utilizada a resina de troca iônica Q Sepharose FF, que foi inicialmente equilibrada com 100 mL de tampão fosfato de potássio 25mM, pH 6,5. A seguir, 7,5 mL do extrato previamente purificado, oriundo dos ensaios de precipitação com etanol foi alimentado. Tal extrato foi previamente filtrado em membrana milipore 0,45µm e teve seu pH ajustado para 6,5. O leito foi então lavado com 30 mL do mesmo tampão de equilíbrio, onde observou-se perda de 36% da amostra alimentada. É possível que esta perda tenha acontecido em razão da fraca ligação entre a enzima e a matriz adsorvente, permitindo que a enzima fosse desorvida por arraste.

Após a eluição, realizada em gradiente salino de 0-1M, com volume total de 50 mL, foi recuperada apenas 7,5% da enzima inicialmente alimentada. Este valor foi considerado baixo, uma vez que técnicas

cromatográficas em geral propiciam recuperações da ordem de 70%. O cromatograma deste processo pode ser observado na Figura 2.

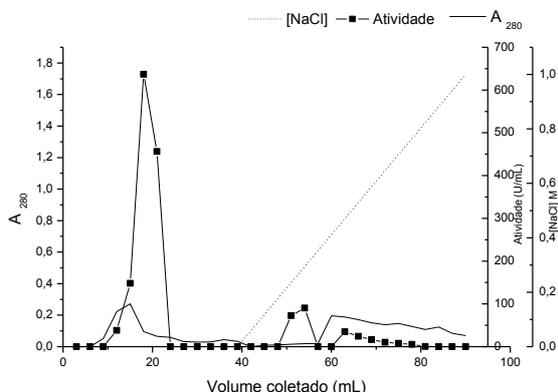


Figura 2: Cromatograma do processo de purificação em coluna de troca iônica com resina Q Sepharose FF

Observa-se que durante as etapas de alimentação e lavagem há um pico de atividade enzimática, mostrando que a enzima não foi adsorvida adequadamente e que quando a eluição iniciou, apenas uma pequena fração da PFO pode ser recuperada. Tal fato pode ter acontecido em razão da utilização de um caldo bruto de PFO, contendo uma grande variedade de constituintes entre enzimas, carboidratos e lipídios. Dessa forma, um outro composto deste extrato que tenha maior afinidade com a matriz ligante pode ser tido sua adsorção favorecida sobre a PFO, ocupando todos os sítios de ligação da resina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que a cromatografia possa ser utilizada na purificação de polifenoloxidase se faz necessário um tratamento prévio do material de interesse, como a utilização de outras técnicas de purificação, visando aumentar a recuperação da enzima. Essas considerações levam em conta o fato de que 36% da amostra injetada na coluna tenha permeado pela coluna sem que ocorresse a adsorção, e da pequena percentagem de recuperação da enzima inicialmente alimentada, apenas 7,5%.

AGRADECIMENTOS

FAPERGS; CNPq; Vinícola Peruzzo; Vinícola MIOLO; Laboratório de Microbiologia e Tóxicologia de Alimentos-UNIPAMPA.

5. REFERÊNCIAS

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.1, p.99-106, (2005).

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades Físico-Químicas de Polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, p.69-72, (2001).

KOBLITZ, M. G. B.; Bioquímica de Alimentos. Guanabara Koogan, 2008.

LIMA, E. D. P.A; PASTORE, G.P; BARBERY, S.D.F; GARCIA, N.H.P.; DE BRITO, E.S.; LIMA, A.A.B. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L.) *Rev. Bras. Frutic.*, vol.23, no.3, (2001).

MELO, G.A., **Purificação da enzima polifenoloxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico.** Tese de doutorado, Unicamp: Campinas, (2005).

PERONE, C. A. S., Determinação de polifenóis(taninos) em produtos alimentícios (chás) usando biossensor de Polifenol oxidase, obtida de extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*) e caracterização desse biossensor. *r. Rev Inst Ciênc &Saúde.* 2009;27(1):28-34