

## IMOBILIZAÇÃO DE FITASE EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Mayerlenis J. Rojas<sup>1</sup>, Marina Momesso<sup>1,2</sup>, Luiz H. C. Mattoso<sup>1</sup>, Cristiane S. Farinas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Instrumentação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, São Carlos, SP,

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG  
mayerlenis@gmail.com

**Classificação:** Processos de imobilização de biomoléculas e funcionalização em nanopartículas

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização da enzima fitase usando nanopartículas de quitosana. As nanopartículas de quitosana produzidas por aspersão em um sistema de fiação por sopro foram utilizadas para imobilizar a fitase mediante três métodos: adsorção, adsorção seguida por entrecruzamento com amido-aldeído e entrecruzamento simultâneo entre enzima-amido e quitosana. Os três métodos se mostraram altamente eficientes apresentando rendimentos superiores a 92%. Dentre os métodos estudados a adsorção seguida por entrecruzamento com amido-aldeído rendeu o derivado mais ativo apresentando 90,8% de atividade recuperada. Estes resultados indicam possíveis aplicações deste biocatalisador na indústria de rações animais.

**Palavras-chave:** Quitosana; Nanopartículas; Fitase, Imobilização

### PHYTASE IMMOBILIZATION ON CHITOSAN NANOPARTICLES

#### Abstract

The aim of this work was to study the immobilization of phytase on chitosan nanoparticles. Chitosan nanoparticles produced by spraying in a solution blow spinning system were used to immobilize phytase by three methods: adsorption, adsorption followed by cross-linking with aldehyde-starch (DAS) and simultaneous cross-linking between enzyme-DAS and chitosan. The three methods were highly efficient with yields higher than 92%. Among the studied methods the adsorption followed by cross-linking with DAS yielded the most active derivative, which showed 90.8% of activity recovery. These results indicate possible applications of this biocatalyst in the animal feed industry.

**Keywords:** Chitosan; Nanoparticles; Phytase; Immobilization.

### 1 INTRODUÇÃO

O fitato é a principal forma de armazenamento do fósforo nos cereais e leguminosas, constituindo entre 60-90% do teor total de fósforo nas plantas. A alimentação animal é principalmente de origem vegetal (sementes oleaginosas, grãos de cereais e leguminosas) e, por conseguinte, contém muito fitato (Reddy, 1982). No entanto, estima-se que cerca de dois terços deste fósforo é pouco digerido pelos organismos monogástricos, já que estes não produzem quantidades suficientes da enzima fitase para hidrolisar o fitato (Bedford 2000). Consequentemente, fontes de fósforos inorgânicos são usualmente adicionadas às rações animais.

Embora a suplementação de fósforo inorgânico nas rações animais aumente a sua disponibilidade, a grande maioria do fósforo que não é assimilado pelos organismos termina no meio ambiente mediante a secreção das fezes, causando problemas de contaminação e poluição. Assim, a degradação do fitato por enzimas exógenas aumentaria a disponibilização do fósforo e minerais nos animais e reduziria o impacto ambiental causado pelas elevadas cargas de fósforo nos efluentes agrícolas (Kumar et al

2016). Contudo, a fragilidade operacional destas enzimas em condições extremas de pH e temperatura são as principais limitações do uso das fitases nas rações animais.

Uma alternativa para contornar esses inconvenientes consiste na imobilização de enzimas usando suportes sólidos. Recentemente, a imobilização de enzimas em nanopartículas vem ganhando cada vez mais interesse devido à grande área superficial destes materiais, a qual permite imobilizar maior quantidade de enzima por unidade de massa (Greiner et al, 2013). Entre os materiais mais amplamente utilizados, destaca-se a quitosana por ter muitas propriedades biológicas tais como: não toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Lee et al, 1995). Neste contexto, este trabalho tem por objetivo desenvolver um biocatalisador não tóxico com possíveis aplicações para rações animais mediante a imobilização da enzima fitase em nanopartículas de quitosana.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A enzima Fitase (Smizyme Phytase 5000) utilizada foi produzida pela Beijing Smile feed Sci (China). Quitosana foi adquirida da Polymar (Fortaleza, Brasil), ácido fítico da marca Sigma-Aldrich SA (St. Louis, MO, EUA). Amido sóluvel, molibdato de amônio e ácido tricloroacético foram adquiridos da Synth (Brasil). Outros reagentes de grau analítico.

### 2.2 Métodos

Preparação das nanopartículas de quitosana. As nanopartículas foram preparadas por aspersão usando um sistema de fiação por sopro. Uma solução de quitosana (10 g/L) em ácido acético 2% (v/v) foi transferida a uma seringa de vidro e ejetada a uma vazão de 0.1 ml/min usando uma bomba de infusão (New Era, modelo NE-300). A solução foi aspergida usando ar comprimido a 2 Psi e coletada em 50 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio (0,1 g/L) sobre agitação magnética. As nanopartículas foram centrifugadas por 15 min a 8000 rpm e resuspendidas em água destilada para posterior uso.

Imobilização de Fitase. As nanopartículas de quitosana (200 mg) foram subersas em 5 mL de uma solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio (pH 7, 5mM), contendo uma carga enzimática de 10 mg de proteína/g suporte. A suspensão (solução enzimática + suporte) e o branco reacional (solução enzimática sem suporte) foram mantidos sob agitação a 25°C. A imobilização da fitase nas nanopartículas de quitosana foi realizada por 3 métodos: adsorção (realizada por um tempo de 24 h), adsorção (22 h, pH 7, 5mM) seguida por entrecruzamento com amido-aldeído (3 h, pH 7, 5mM) e entrecruzamento simultaneo (quitosana-fitase e amido-aldeído) por 24 h. As etapas de entrecruzamento foram realizadas adicionando 250 µL de uma solução de amido-aldeído (30 g/L) ao início da imobilização (no caso do entrecruzamento simultâneo) ou após 22 h de adsorção para o caso da adsorção seguida por entrecruzamento. Após o período de imobilização os derivados (enzima imobilizada) foram lavados 2 vezes com tampão fosfato (pH 7, 5mM), centrifugados e resuspendidos em 5 ml de tampão acetato (100 mM, pH 5,5). O parâmetros da imobilização, rendimento e atividade recuperada, foram calculadas usando as equações (1) e (2) respectivamente:

$$R_I(\%) = (1 - A_{fs}) \times 100 \quad (1)$$

$$A.R(\%) = \left( \frac{A_D}{A_0 \times R_I} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$A_{fs} = \frac{\text{Atividade final do sobrenadante}}{\text{Atividade final do branco}} \quad (3)$$

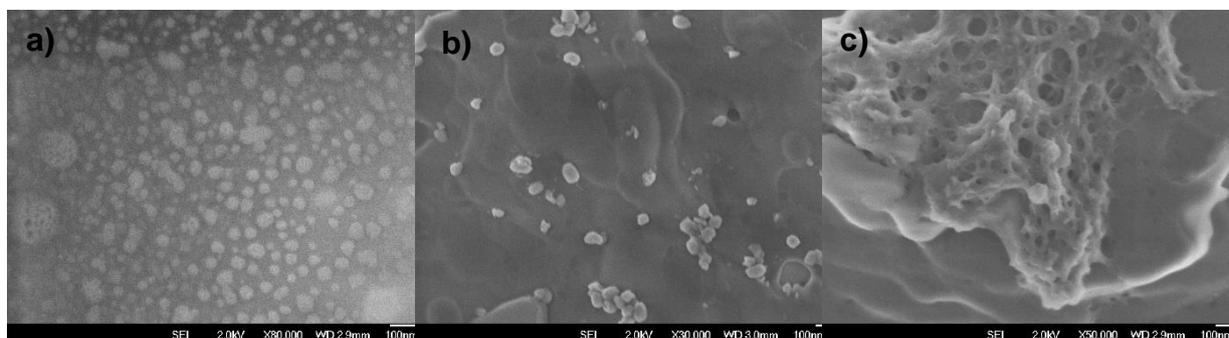
Onde  $R_I$  é o rendimento da imobilização,  $A.R$  é a atividade recuperada,  $A_{fs}$  é a atividade da enzima não imobilizada ao final do processo de imobilização,  $A_D$  é a atividade do derivado (enzima imobilizada),  $A_0$  é a atividade inicial oferecida para a imobilização.

**Determinação da atividade enzimática da fitase.** A atividade da fitase foi determinada quantificando-se a liberação de fosfato em um período de 15 min de hidrólise de ácido fítico catalisada pela enzima. A concentração de fosfato liberado foi medida empregando o método descrito por Harlan e Harlan (1980). O substrato na concentração de 2.5 mM era diluído em tampão acetato (50 mM, pH 5.5), e esta solução eram adicionados determinados volumes de solução enzimática livre ou derivado (resuspendido em tampão), a mistura resultante era incubada a 37°C por 15 min sob agitação. Após o período de reação, era retirada uma alíquota de 400 µL do meio reacional e a reação era interrompida adicionando 200 µL de ácido tricloroacético 10% m/v. Em seguida, foram adicionados 200 µL de água destilada e 500 µL do reagente Taussky Schoor. As absorbâncias foram medidas a 660 nm, contra um branco contendo 0,4 mL de substrato (fitato de sódio em tampão acetato) sem a presença da enzima. A quantificação do fosfato liberado foi realizada usando uma curva padrão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Uma unidade de atividade fitasica (FTU) foi definida como a quantidade de fitase requerida para liberar 1 µmol de fósforo em 1 min nas condições de ensaio (pH 5,5; 37°C).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1a apresenta a morfologia e o tamanho das nanopartículas de quitosana. Nota-se que a grande maioria das nanopartículas apresentou formas esféricas com pequenas porosidades e tamanhos de partícula com diâmetros menores que 100 nm. As nanopartículas de quitosana usadas para a adsorção da fitase (Fig. 1b) não apresentaram cavidades, mostrando que estes espaços vazios foram ocupados provavelmente pelas moléculas de enzimas. Observa-se também que o entrecruzamento simultâneo das enzimas com as partículas de quitosana utilizando amido-aldeído, além de formar ligações covalentes entre os grupos aldeídos do amido-aldeído e os grupos aminos da quitosana também levou a uma macro-reticulação entre as nanopartículas de quitosana e enzima, formando derivados de maior tamanho.

**Figura 1.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG) das partículas de quitosana (a), enzima adsorvida nas nanopartículas (b), enzima imobilizada por entrecruzamento simultâneo com amido-aldeído (c).



Na presença de polieletrólitos aniônicos, tais como o tripolifosfato de sódio, a quitosana forma esferas compostas em sua superfície por grupos hidroxilas e amins, que as tornam interessantes para a imobilização de enzimas (Viera et al, 2013). A Tabela 1 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na imobilização da fitase usando nanopartículas de quitosana. Observa-se que a adsorção da fitase nas nanopartículas seguidas por entrecruzamento com amido-aldeído apresentou a máxima atividade recuperada (90,8 %), provavelmente a adição do amido aldeído após as 22 h favoreceu o acoplamento da enzima adsorvida à quitosana mediante ligações covalentes. Por outro lado, longos períodos de entrecruzamento simultâneo (24 h) entre a enzima e o suporte levaram à distorção da estrutura da enzima por entrecruzamento excessivo, rendendo derivados com a menor atividade recuperada (72 %).

**Tabela 1.** Parâmetros da imobilização da fitase em nanopartículas de quitosana

Método de imobilização	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)
Adsorção	92,1	81,8
Adsorção(pH 7, 5mM, 22h) seguida por ligação covalente (pH 7, 5mM, 3h)	99,2	90,8
Entrecruzamento simultâneo (pH 7, 5mM, 24h)	99,7	72,6

#### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se que as nanopartículas de quitosana preparadas por aspersão em sistemas de fiação por sopro apresentaram resultados promissores na utilização como suporte para a imobilização de fitase por adsorção física, adsorção e reticulação com amido e entrecruzamento simultâneo. Este biocatalisador (de baixa citotoxicidade) apresenta um grande potencial de aplicação para ser suplementado nas rações animais.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa, MCTI/SISNANO, CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- Bedford, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, v. 86, p. 1-13, 2000.
- Greiner et al. Production of partially phosphorylated myo-inositol phosphates using phytases immobilised on magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 375–383, 2013.
- Harland, B.F. and J. Harland. Fermentative reduction of phytic acid in rye, wheat and whole wheat bread. *Cereal Chem.*, v. 57, p.226-229, 1980.
- Kumar A., Chanderman A. and Singh S. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Journal Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 46, 2016.
- Lee, K.Y., Ha, S.W., Park, W.H. Blood biocompatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials* v.16, p.1211–1216, 1995.
- Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research*, v. 28, p. 1- 92, 1982.
- Vieira et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by B-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 54- 64, 2013.