



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

INVESTIGAÇÃO DE BEADS MAGNETICAS DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Márjorie Castro Pinto PORFIRIO^{*}; Jonathan Barbosa SANTOS; Ester Rocha SANTOS; Jennifer Renata Brasil dos SANTOS; Alexsandra Nascimento FERREIRA; Rafael da Costa Ilhéu FONTAN³.

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Engenharia de Processos;

³Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

*E-mail para contato:marjoriecporfirio@hotmail.com

RESUMO – As enzimas são amplamente aplicadas em diversos setores industriais, entretanto apresenta como desafios a baixa estabilidade e reutilização, o que torna os processos mais onerosos. Com isso, estratégias são empregadas, como a tecnologia de imobilização que visa amenizar esses entraves. O estudo teve como objetivo produzir microesferas magnéticas de quitosana para imobilização enzimática. Os Beads magnéticos de quitosana foram sintetizados por co-precipitação de íons de ferro. Utilizou-se a Lisozima como enzima modelo. Para imobilização as microesferas magnéticas foram mantidas em contato com uma solução de Lisozima a 1mg/ml por um período de 12 h para a retenção. Foram avaliados a capacidade adsorptiva, eficiência de imobilização e análise de FTIR verificar os grupos funcionais presentes no suporte que caracterizam a imobilização enzimática. Os espectros de FTIR indicaram eficiência na produção dos suportes magnéticos pelo aparecimento de modos vibracionais característicos, bem como a adsorção da lisozima. Os suportes apresentaram uma capacidade adsorptiva de cerca de 17mg/g e aproximadamente 50% de eficiência. Os resultados indicam que mais estudos são necessários para avaliar a estabilidade e o potencial de reutilização da enzima, entretanto demonstram o potencial do suporte para testes em outros tipos e classes enzimáticas, com potencial aplicação em processos adsorptivos.

Palavras-chave: Adsorção; lisozima; esferas magnéticas; óxido de ferro.

INVESTIGATION OF CHITOSAN MAGNETIC BEADS AS SUPPORT FOR ENZYMATIC IMMOBILIZATION

ABSTRACT – Enzymes are widely applied in several industrial sectors, however, one of the challenges is low stability and reusability, which makes the processes more expensive. Therefore, strategies are employed, such as immobilization technology, which aims to alleviate these obstacles. Therefore, the study aimed to produce magnetic chitosan microspheres for enzyme immobilization. The magnetic chitosan beads were synthesized by co-precipitation of iron ions. Lysozyme was used as a model enzyme. For immobilization, the magnetic



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

microspheres were kept in contact with a 1 mg/ml Lysozyme solution for a period of 12 h for retention. The adsorptive capacity, immobilization efficiency and FTIR analysis were evaluated to verify the functional groups present in the support that characterize enzyme immobilization. The FTIR spectra indicated efficiency in the production of magnetic supports due to the appearance of characteristic vibrational modes, as well as the adsorption of lysozyme. The supports showed an adsorptive capacity of approximately 17 mg/g and approximately 50% efficiency. The results indicate that further studies are needed to evaluate the stability and reuse potential of the enzyme; however, they demonstrate the potential of the support for testing other enzyme types and classes, with potential application in adsorptive processes.

Keywords: Adsorption; lysozyme; magnetic beads; iron oxide.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas, são reconhecidas por sua especificidade precisa ao substrato, seletividade e capacidade de funcionar em condições amenas, e desempenham um papel crucial em indústrias químicas, alimentícias e cosméticas (Porfirio et al., 2024; Shomal et al., 2024). No entanto, desafios, como baixa estabilidade e recuperação, resultam em aumento de custos e diminuição da eficiência da produção, dificultando a utilização a nível industrial (Abellanas-Perez et al, 2023).

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias que possam aumentar a estabilidade enzimática apresenta um grande interesse. A tecnologia de imobilização tem se apresentado como uma alternativa, aumentando a estabilidade enzimática, evitando a dissociação de subunidades, reduzindo a agregação, autólise ou proteólise e criando microambientes favoráveis, além de aumentar a especificidade enzimática alterando a estrutura do centro ativo (Shomal et al., 2024).

Os métodos convencionais de imobilização enzimática incluem adsorção não covalente, incorporação e ligação covalente. As ligações covalentes estáveis evitam o vazamento da enzima do transportador e, assim, melhoram muito a estabilidade e a reutilização das enzimas (Zhang et al., 2024). As enzimas imobilizadas podem ser recuperadas e reutilizadas com eficiência, utilizando uma variedade de materiais como transportadores, incluindo polímeros, sílica, estrutura metal-orgânicas, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, e nanopartículas de ouro (Niu et al., 2023).

As nanopartículas magnéticas têm atraído mais atenção dos pesquisadores da área de imobilização enzimática em virtude de suas propriedades únicas como a fácil separação magnética do substrato, grandes áreas de superfície específicas e boa biocompatibilidade (Zhang et al., 2024). Esses materiais apresentam como potencial melhores desempenhos que os suportes convencionais, além de possibilitar uma separação mais rápida por campo magnético externo, reduzindo o tempo e custos (Niu et al., 2023).

A quitosana é um produto natural, renovável e biodegradável, possuindo um grande número de grupos hidroxila e amina que podem quelar com metais para formar adsorventes de esferas de metal-quitosana (micro e nanopartículas). A quitosana possui excelentes propriedades químicas, como estabilidade química e compatibilidade com compostos bioativos. Os grupos hidroxila ativos e aminoácidos presentes nas moléculas de quitosana podem ser



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

modificados com vários grupos funcionais por meio de modificação molecular ou química, ampliando sua gama de aplicações (Cerón et al., 2023).

A lisozima é uma enzima com grande aplicação nas indústrias farmacêuticas, no diagnóstico clínico de doenças, e nas indústrias alimentícias como conservantes, principalmente de produtos lácteos e cárneos, devido ao seu potencial antimicrobiano (Santos et al., 2024; Cerón et al., 2023). O uso de lisozima livre em aplicações práticas é limitado pela instabilidade em temperaturas elevadas e cargas proteolíticas (Cerón et al., 2023). Portanto, protocolos para imobilização lisozima que visem o aumento da estabilidade são necessários.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi sintetizar microesferas magnéticas de Fe_3O_4 a base de quitosana, voltadas para imobilização de enzimas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Para execução desse trabalho foram utilizados reagentes que possuíam no mínimo grau analítico PA-ACS. Cloreto de ferro anidro (FeCl_3), sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), Quitosana (95 % de desacetilação) e a Lisozima *Lysozyme from Chicken egg White* (CAS: 12650-88-3). Os demais reagentes utilizados estão descritos ao decorrer do trabalho.

2.2. Síntese das Beads magnéticas

As beads magnéticas foram preparados por Co-precipitação dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} de acordo metodologia descrita por (Kumar et al., 2013), com modificações. Preparou-se 100 mL de solução contendo 1,5 % de ácido acético e 1,5% de quitosana, sendo mantida sob agitação magnética até total dissolução. Posteriormente adicionou-se 100 μL de glutaraldeído (25 %) seguido dos sais de ferro. 1 M de FeCl_3 e 0,5 M de FeSO_4 . Após isso, a solução foi gotejada lentamente com auxílio de seringa em uma solução de 4 M de NaOH . As beads magnéticas foram deixadas em solução por 24 h. Posteriormente, foram lavados até atingir o pH 7 e secos em estufa a 60 °C.

2.3. Imobilização da Lisozima

Para o processo de imobilização 50 mg beads foram mantidos em contato com 5 mL de glutaraldeído 5% por 4 h. à 37 °C. Posteriormente as partículas foram lavadas com tampão fosfato de sódio (0,02 Mol e pH 6) por 30 min. Em seguida, foram mantidos em contato com 5 mL da solução de Lisozima 1 mg/mL de Lisozima por 12 h a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford (1975) a 595 nm. Para isso foi construído uma curva de calibração analítica utilizando uma solução de lisozima padrão, nas concentrações de 0,1 a 1 mg.mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade de adsorção foi calculada por meio da equação 1:

$$q = \frac{(c_0 - c) \times V}{M} \quad (1)$$

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

Em que q se refere a concentração de lisozima imobilizada ao criogel (mg.g^{-1} de criogel seco); c_0 e c são as concentrações iniciais e finais de lisozima (mg.mL^{-1}) respectivamente; M é a massa de criogel seco; e V é o volume de solução de lisozima (mL).

Também foi calculada a eficiência de imobilização de acordo com a equação 2.

$$\text{Eficiência de Imobilização (\%)} = \frac{\text{Massa de enzima Inicial}}{\text{Massa de enzima Retida}} \times 100 \quad (2)$$

2.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presentes nos suportes secos foram avaliados qualitativamente por FTIR utilizando a técnica da reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500 cm^{-1} em espectrômetro (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1, apresenta os espectros de FTIR realizado para identificação de grupos funcionais presentes nos materiais produzidos.

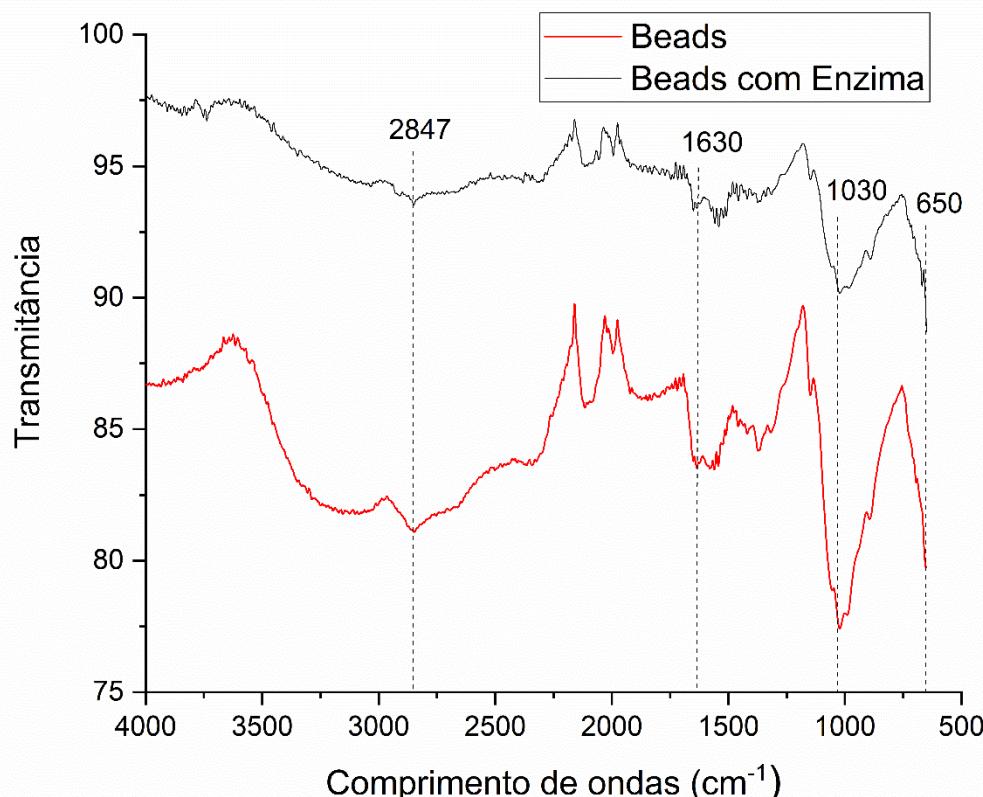


Figura 1. Espectro FTIR das beads magnéticas produzidas

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

As análises de FTIR realizadas nas *beads* magnéticas de quitosana, demonstraram sutis mudanças nos espectros, como o alargamento ou diminuição em algumas bandas de absorção. Isso ocorre, pois, a inserção da enzima ao suporte não trás mudanças significativas ao espectro, uma vez que a quitosana, composto orgânico, possui grupos químicos semelhantes ao da enzima imobilizada. O modo vibracional identificado na região de 650 cm^{-1} tem relação às vibrações de tração intrínsecas de Fe-O presentes na estrutura do Fe_3O_4 , em trabalhos realizados por Nouri & Khodaiyan, (2020) esse padrão também foi observado, quando produziram o mesmo material para imobilização de pectinase. Outro comprimento observado foi de 1030 cm^{-1} , segundo Hamza et al. (2022) indica vibrações de alongamento de C-O-C e vibrações de estiramento de C-O presente na estrutura glicosídica quitosana. Vale ressaltar que houve uma redução na absorção desse modo vibracional após o processo de adsorção da lisozima, esse comportamento pode ter relação à substituição desses grupos por ligações entre o suporte e a enzima.

Um modo vibracional foi encontrado no comprimento de onda de 1630 cm^{-1} para amostra beads com enzima, segundo Hamza et al. (2022) o aparecimento desse modo na amostra está relacionado a formação de grupos amida, entre o aldeído do glutaraldeído e a amina terminal presentes na enzima, reafirmando a eficácia no processo de adsorção. Finalmente, pode ser verificado um comprimento de onda em 2847 cm^{-1} , que indica a presença de vibrações de alongamento C-H em ambas as amostras, como esperado em materiais orgânicos, o mesmo comportamento foi observado em trabalhos realizados por Cigeroglu et al. (2021) e Apriceno et al. (2021).

Os resultados referentes a capacidade de imobilização e eficiência estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da eficiência dos Beads produzidos.

Parâmetros de imobilização	Massa Inicial (mg)	Massa Retida (mg)	Capacidade Adsorptiva (mg/g)	Eficiência de imobilização (%)
	$1,84 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,02$	$17,19 \pm 0,09$	$49,72 \pm 1,23$

Os dados indicaram uma eficiência de imobilização próximo a 50%. Cerón et al., 2023 obtiveram um valor inferior de 20% ao imobilizarem lisozima em microesferas de quitosana. De acordo com esses autores, limitações difusionais podem causar uma diminuição na atividade. Segundo Saranya et al. (2015) a ligação da lisozima à magnetita ocorre por meio da coordenação entre íons metálicos com cadeia lateral doadora de elétrons de resíduos como histidina e cisteína. A lisozima só possui um resíduo de histidina que deve ser o sítio de ligação de afinidade dominante na imobilização da lisozima como Fe^{3+} imobilizado ao suporte. Essas limitações afetam a flexibilidade molecular da enzima no processo de imobilização, o que pode dificultar o acesso aos locais ativos e tornar inacessível, o que reduz a área de superfície disponível para imobilização.

Quanto à capacidade adsorptiva, Bayramoglu et al. (2022) utilizando um adsorvente magnético atingiu $30,8\text{ mg/g}$, superior aos valores obtidos neste estudo. Enquanto, Yin et al., 2024 verificaram valores que variaram entre $27,42$ e $49,80\text{ mg/g}$ para adsorção de arsênio em esferas de quitosana com óxido de ferro, essas variações podem estar relacionadas ao tamanho das partículas, tipo de funcionalização bem como com a molécula alvo. Além disso, a lisozima apresenta um alto ponto isoelétrico, ou seja, uma elevada densidade de cargas positivas, assim a adsorção seria favorecida se o suporte estivesse carregado negativamente (Santos et al., 2024),



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

o que pode justificar os resultados verificados neste estudo. Os resultados obtidos indicam que é necessária uma continuidade no estudo, a fim de avaliar a atividade enzimática, estabilidade da enzima e o potencial de reutilização.

4. CONCLUSÃO

Os modos vibracionais encontrados na análise de FTIR revelaram a eficiência no desenvolvimento das beads magnéticas revestidas com quitosana, bem como na adsorção da lisozima ao suporte magnético. Foi possível desenvolver Beads magnéticos com potencial de utilização como suportes para imobilização de enzimas, com uma eficiência de imobilização próximo a 50%. Os resultados obtidos são promissores e podem ser utilizados como base para outros estudos na área. Ademais, um estudo mais aprofundado deve ser conduzido a fim de otimizar a imobilização da enzima, verificar sua estabilidade e a reutilização, além da possível investigação desse suporte na imobilização de outros tipos de enzimas, visando a sua utilização como uma alternativa de métodos para reduzir os dos processos industriais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL-UESB) e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela oportunidade e condições de realização do trabalho e o apoio financeiro concedido pela FAPESB.

6. REFERÊNCIAS

ABELLANAS-PEREZ, P., CARBALLARES, D., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROCHA-MARTIN, J. Glutaraldehyde modification of lipases immobilized on octyl agarose beads: Roles of the support enzyme loading and chemical amination of the enzyme on the final enzyme features. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 248, p. 125853, 2023.

APRICENO, A., SILVESTRO, I., GIRELLI, A., FRANCOLINI, I., PIETRELLI, L., PIOZZI, A. Preparation and characterization of chitosan-coated manganese-ferrite nanoparticles conjugated with laccase for environmental bioremediation. *Polymers*, v. 13, n. 9, p. 1453-1470, 2021.

BAYRAMOGLU, G., KILIC, M., ARICA, M. Y. Selective isolation and sensitive detection of lysozyme using aptamer based magnetic adsorbent and a new quartz crystal microbalance system. *Food Chemistry*, v 328, 132353, 2022.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CERÓN, A., COSTA, S., IMBERNON, R., QUEIROZ, R., CASTRO, J., FERRAZ, H., OLIVEIRA, R., COSTA, S. Study of stability, kinetic parameters and release of lysozyme immobilized on chitosan microspheres by crosslinking and covalent attachment for cotton fabric functionalization. *Process Biochemistry*, v. 128, p. 116-125, 2023.

CIGEROGLU, Z., KUÇUKYILDIZ, G., ERIM, B., ALP, E. Easy preparation of magnetic nanoparticles r-GO-chitosan composite beads: Optimization study on cefixime



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

removal based on RSM and ANN by using genetic algorithm approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, 2021.

HAMZA, M. F., HAMAD, D. M., HAMAD, N. A., ABDEL-RAHMAN, A. A. H., FOUDA, A., WEI, Y., GUIBAL, E., EL-ETRAWY, A-A. S. Functionalization of magnetic chitosan microparticles for high-performance removal of chromate from aqueous solutions and tannery effluent. **Chemical Engineering Journal**, v. 428, 2022

KUMAR, S., JANA, A. K., DHAMIJA, I., SINGLA, Y., MAITI, M. Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 413-426, 2013.

NIU, Y., WU, J., KANG, Y., SUN, P., XIAO, Z., ZHAO, D. Recent advances of magnetic chitosan hydrogel: Preparation, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.247, p. 125722, 2013.

NOURI, M., KHODAIYAN, F. Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly-aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, 2020.Biotechnology

PORFIRIO, M. C. P., SANTOS, J. B., ALVES, A. N., SANTOS, L. S., BONOMO, R. C. F., FONTAN, R. C. I. Purification of pineapple bromelain by IMAC chromatography using chlorophyll-activated macroporous matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 1234, p. 124027, 2024.

SANTOS, J. B., PORFIRIO, M. C. P., SANTOS, M. P. F., SOUZA, Y. G., BONOMO, R. C. F., FONTAN, R. C. I. Development of a glutamate-functionalized macroporous exchange matrix for partial purification of lysozyme from chicken egg white. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 694, p. 134224, 2024.

SHOMAL, R., ABDELKAREEM, M. A., OLABI, A. G., ZUHAIR, S.A. Macro porous ZIF-8 beads: Promising supports for enzyme immobilization. **Materials Today sustainability**, v. 25, p. 100632, 2024.

YIN, Y., XU, Y., LUAN, Y-N, ZHAO, Z., XIAO, Y., LIU, C. Enhanced oxidation and adsorption of arsenite by porous Fe-Mn binary chitosan beads and its application in fixed-bed column. **Journal of Molecular Structure**, v. 1308, p 132973, 2024.

ZHANG, Q., LI, N., HOU, Y., FAN, M., ZHANG, Y., DANG, F. Co-immobilization of crosslinked enzyme aggregates on lysozyme functionalized magnetic nanoparticles for enhancing stability and activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 273, p. 133180, 2024.