

EMPREGO DE QUITOSANA EXTRAIDA DO CAMARÃO SETE-BARBAS *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS

Rafael David Souto de Azevedo¹, Célio Henrique de Alcântara Brandão¹, Kívia Vanessa Gomes Falcão¹, Amália Cristine Medeiros Ferreira¹, Ranilson de Souza Bezerra¹

¹ Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências - CB, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Campus Recife. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235. Cidade Universitária. Recife - PE. Autor correspondente: (RDSA) rafaeldavidbio@gmail.com

RESUMO

A obtenção de biomoléculas, como a quitosana, de resíduos do processamento do pescado representa uma ótima oportunidade para recuperar moléculas bioativas com propriedades únicas e para realizar o aproveitamento integral dos recursos naturais. Assim, o presente trabalho visou obter quitosana de carapaças do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* e utilizá-la como suporte para imobilização de enzimas. A quitosana foi obtida com sucesso após etapas de descalcificação, desproteinização remoção de pigmentos e desacetilação. A quitosana foi magnetizada e ativada para imobilização utilizando glutaraldeído a 12,5%. Soluções de 1mg/mL de Tripsina ou Pepsina foram incubadas com a quitosana ativada. O melhor desempenho catalítico para ambas enzimas digestivas foi observado a 50°C e ao pH 9,0. Contudo, observa-se diferenças quanto à estabilidade da atividade destas enzimas diante alterações no pH e temperatura. Ao observar a viabilidade da quitosana em manter a enzima estável após 5 semanas de estocagem registra-se que as enzimas perderam 20% e 60% de atividade (tripsina e pepsina, respectivamente). Após testes de 10 reusos a tripsina perdeu 17,6% e pepsina 42,04% da atividade inicial. Com isso conclui-se que a quitosana é um suporte viável para imobilização de enzimas, especialmente para tripsina, além de constitui-se uma alternativa sustentável para as atividades marinhas realizadas atualmente dada possibilidade de aproveitamento de resíduos do pescado que usualmente são descartados.

Palavras-chave: Resíduos do pescado. Biomoléculas de Organismos Aquáticos. Biotecnologia. Sustentabilidade.

ABSTRACT

Obtaining biomolecules, such as chitosan, from fish processing waste represent an excellent opportunity to recover bioactive molecules with unique properties and demonstrate how to make full use of natural resources. Thus, the present work aimed to obtain chitosan from shells and heads of the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* and uses it as support for immobilization of enzymes. Chitosan was successfully obtained after steps of decalcification, deproteinization, removal of pigments and deacetylation. Chitosan was magnetized and activated for immobilization using 12.5% glutaraldehyde. 1mg / mL solutions of Trypsin or Pepsin were incubated with activated chitosan. The best catalytic performance for both digestive enzymes was observed at 50 ° C and at pH 9.0. However, there are

differences in the stability of the activity of these enzymes due to changes in pH and temperature. When observing the viability of chitosan to keep the enzyme stable after 5 weeks of storage, enzymes lost 20% and 60% of activity (trypsin and pepsin, respectively). After 10 replicate tests trypsin lost 17.6% and pepsin 42.04% of initial activity. With this, it is concluded that chitosan is a viable support for the immobilization of enzymes, especially for trypsin, and constitutes a sustainable alternative for marine activities currently carried out given the possibility of taking advantage of fish waste that is usually discarded.

Keywords: Biomolecules of Aquatic Organisms. Biotechnology. Fish processing waste. Sustainability.

INTRODUÇÃO

A quitina é o principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes como caranguejos e camarões, esse polissacarídeo é facilmente convertido em quitosana, que é um polímero de variadas aplicações dada sua elevada biocompatibilidade, especialmente em biotecnologia Jayakumar *et al.* (2011). A obtenção de um polímero tão versátil a partir de resíduos do processamento de camarões constitui-se uma ferramenta altamente atrativa uma vez que o destino destes resíduos usualmente é o lixo comum e/ou o meio ambiente. Diante disto, diversas ferramentas biotecnológicas podem atuar agregando valor a resíduos do processamento do pescado e subsidiando caminhos para exploração mais racional dos recursos naturais Bezerra *et al.* (2001); Ferraro *et al.* (2010); Azevedo, (2013).

Biomateriais a base de quitosana têm sido uma boa maneira para valorização de subprodutos marinhos Ferraro *et al.*, (2010) além de apresentar vantagens quando comparados a materiais sintéticos Jayakumar *et al.*, (2011). O uso de biomateriais a base de quitosana para

imobilização de enzimas é realizada desde 1960 Dwevedi, (2016) e tem possibilitado aplicações para indústria de alimentos, fármacos e de remoção de contaminantes, além de viabilizar investigações sobre as melhores condições para manutenção e aplicação das enzimas imobilizadas Seo *et al.*, (2012); Vieira *et al.*, (2013). De tal modo, a busca por fontes para obtenção de quitosana pode contribuir efetivamente para um progresso científico nessa área, além de colaborar para sustentabilidade das atividades pesqueiras através do aproveitamento integral do pescado.

O *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Penaeidae) é o principal camarão alvo de pesca no litoral brasileiro, tendo a captura atingido a marca de 15.417t em 2011 MPA (2012). Integrada a elevada captura, registra-se a pressão por este recurso e as possibilidades de exaurir as populações destes organismos dos ambientes aquáticos nacionais, especialmente após a identificação da existência de espécies crípticas para o gênero no país Gusmão *et al.*, (2006). Adsorve-se a problemática que a maior parte de *X. kroyeri* capturado é

comercializado após etapas de processamento (remoção da carapaça e filetagem), o que gera quantidades consideráveis de resíduos que são descartados diretamente no ambiente. Assim, discutir meios para tornar a pesca mais sustentável através de um aproveitamento integral pode representar uma alternativa eficaz para exploração deste recurso natural. De modo que o objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade extração de quitosana do camarão sete-barbas e utilizá-la em biotecnologia como suporte para imobilização de enzimas digestivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção e Magnetização da Quitosana

Resíduos do processamento do *X. kroyeri* foram obtidos da comunidade de pescadores de Barra de Sirinhaém – PE (8° 36' 50.422" S 35° 3' 5.022" W) e levados para o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esse material foi triado manualmente para remoção de contaminantes e triturado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Após essa etapa o material obtido foi submetido a etapas de Descalcificação, Desproteínização, Despigmentação, Desacetilação seguindo metodologia descrita por Cahu *et al.*, (2012) e de Purificação Weska *et al.*, (2007). Em seguida esse material foi liofilizado e magnetizado segundo a metodologia de Azevedo (2013).

Imobilização e atividade das enzimas digestivas

Tripsinas e pepsinas comerciais (1mg/mL) foram ligadas

covalentemente ao suporte utilizando glutaraldeído a 12,5% em temperatura de 4°C, sob suave agitação. Os substratos BApNA a 8μM e Hemoglobina 2% foram incubados com as enzimas imobilizadas para detectar a atividade hidrolítica das enzimas. A atividade das enzimas imobilizadas foi avaliada por espectrofotometria utilizando um leitor de microplacas BioRad XMark™ a 405nm para tripsina e 280 nm para pepsina.

Variações de pH, temperatura e tempo de estocagem

O compósito quitosana magnética/tripsina ou pepsina foi submetido a variações de pH (2 – 10 pH), temperatura (20 – 80°C) e tempo de estocagem durante 5 semanas visando identificar as melhores condições de operação. Ainda foi realizado um teste de avaliação de tempo de estocagem por cinco semanas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para minimizar erros experimentais. Os reagentes utilizados para execução do presente trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich® e GE Healthcare®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra os resultados da atividade enzimática diante variações de temperatura. Para ambas enzimas, o máximo de atividade catalítica foi observado a 50°C. Estes resultados demonstram a estabilidade do composto quitosana magnética + enzimas digestivas para operação em temperaturas elevadas. Esses resultados convergem com os encontrados por Amaral *et al.* (2006) e Azevedo (2013). Ao

observar os efeitos das variações de pH na atividade das enzimas imobilizadas (Figura 2) é possível observar um padrão diferente para tripsina e pepsina. Contudo, ambas possuem maior atividade catalítica em pH 10. Esses resultados divergem dos observados por Amaral *et al.* (2006), que observou pH 8 como ótimo para tripsinas de porco e para tripsinas purificadas do intestino da Tilápia do Nilo. Estes resultados adquirem importância ao se idealizar aplicações em biotecnologia e setores industriais como alimentos, por exemplo.

O teste de tempo de estocagem (figura 3) mostrou que as enzimas imobilizadas tiveram resultados diferentes. A tripsina manteve 76% da atividade inicial, já a pepsina perdeu 71% de sua atividade inicial. Xi *et al.* (2005) obteve resultados semelhantes para tempo de estocagem da tripsina imobilizada em macroesferas de quitosana. Esse resultado demonstra que a quitosana é mais recomendada para imobilização de tripsina, dada viabilidade da atividade enzimática durante o tempo de avaliação. Assim, tornam-se atrativas posteriores aplicações práticas deste compósito.

O experimento de reuso (Figura 4) mostrou que também há maior viabilidade para emprego da tripsina em processos de imobilização. Afinal, a tripsina perdeu somente 17,6%, o que converge com os resultados encontrados por Sun *et al.* 2017. A pepsina, perdeu 42,04% ao fim do 10º reuso. Estes resultados divergem dos observados por Altun e Cetinus (2007) que perderam cerca de 80% de atividade logo após o 6º reuso. Assim, a quitosana

obtida do camarão sete-barbas conseguiu aperfeiçoar parcialmente a catalise realizada pela pepsina.

Assim, é possível assumir que a quitosana obtida do camarão sete-barbas é um bom suporte para imobilização de enzimas, especialmente por não exercer influências negativas na atividade das enzimas imobilizadas. Além disso, a recuperação da quitosana de resíduos do processamento de *X. kroyeri* possibilita a valorização de subprodutos pesqueiros e torna-se uma questão central para uso racional dos recursos naturais e para sustentabilidade na indústria pesqueira.

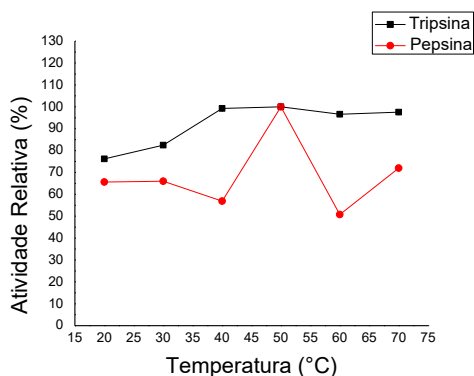


Figura 1: Atividade relativa (%) para as pepsina e tripsina imobilizada. Foi utilizado como substrato para o ensaio BApNA 8 μ M e Hemoglobina 2%.

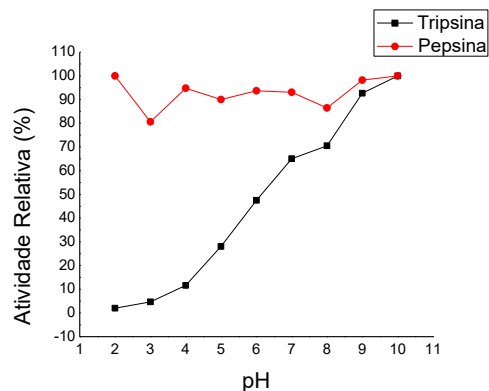


Figura 2: Atividade relativa (%) para tripsina e pepsina sob variações de pH. Os substratos utilizados foram descritos anteriormente.

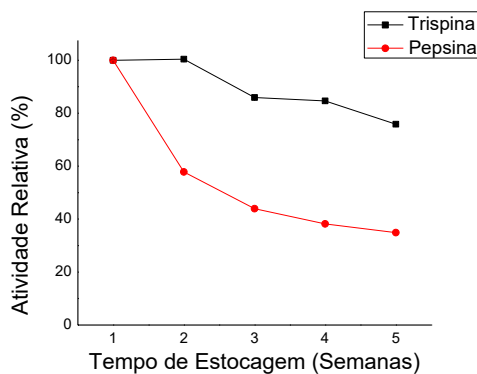


Figura 3: Atividade relativa (%) sobre o tempo de estocagem (em semanas) para as enzimas digestivas imobilizadas.

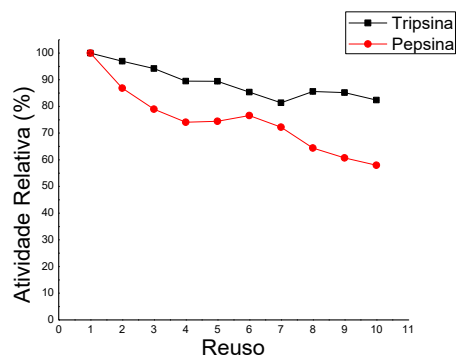


Figura 4: Atividade relativa (%) para reuso das enzimas imobilizadas.

CONCLUSÕES

A obtenção de biomoléculas, como a quitosana, a partir de resíduos do processamento de *X. kroyeri* representa uma oportunidade exequível para o aproveitamento integral deste recurso pesqueiro, além de conceber uma alternativa sustentável para uso dos recursos naturais, principalmente diante da atual pressão para pesca deste camarão. Destaca-se que o emprego de quitosana para imobilização de enzimas digestivas trouxe maior estabilidade contra variações de pH e temperatura para enzima imobilizada. Especialmente para tripsina que além da estabilidade observada após o tempo de estocagem, manteve 83% de sua atividade durante 10 reusos. Assim, assume-se que a quitosana obtida de resíduos do camarão sete-barbas é um suporte biocompatível e viável para futuras aplicações práticas de enzimas imobilizadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Rede de Pesquisa de Carcinicultura do Nordeste, a RECARCINE – FINEP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altun, G. D. & Cetinus, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. Food Chemistry. 100 (7): 964–971.

Amaral, I.P.G, Carneiro da Cunha, M.G. Carvalho Jr, L.B. Bezerra, R.S. (2006) Fish trypsin immobilized on

ferromagnetic Dacron. Process Biochemistry. 41: 1213-1216

Azevedo, R. D. S. 2013. Aplicações tecnológicas de moléculas bioativas obtidas de resíduos do processamento do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*). Univ. Fed. Alagoas. Maceió. MSc. Diss.

Bezerra, R.S.; Santos, J.F.; Paiva, P.M.G.; Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Vieira, V., Carvalho Jr, L.B. (2001), Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*) Journal of Food Biochemistry., 25 (3): 199–210.

Cahu, T.; Santos, S.D.; Mendes, A.; Córdula, C. R.; Chavante, S. F. Carvalho Jr. L.B.; Nader, H.B.; Bezerra, R. S. (2012) Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. Process Biochemistry. 47 (4): 570-577.

Dwevedi, A. (2016) Basics of Enzyme Immobilization p. 21-44. In: DWEVEDI, A. (Ed.). Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. Cham: Springer International Publishing 1: 106p.

Ferraro, V. *et al.* (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. Food Research International. 43 (9): 2221-2233.

Gusmão, J.; Lazoski, C.; Monteiro, F.M.; Solé-Cava, A.M. (2006) Cryptic species and population

structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Marine Biology*. 149 (3): 491.

Heller C. 1982. Beiträge zur näheren Kenntnis der Macruoren. *Sitzungsber Math Naturwiss cl kaiserliche Akad Wiss Wien* 45: 389–426.

Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh-Kumar, P.T.; Nair, S.V.; Tamura, H.; (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 29 (3): 322-337.

Ministério da Pesca de Aquicultura (MPA). 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil, 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. (1): 129. Disponível na World Wide Web em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf. Acesso em 30 jan. 2017.

Sun, J.; Xu, B.; Shi, Y.; Yang, L.; Ma, H.; (2017). Activity and Stability of Trypsin Immobilized onto Chitosan Magnetic Nanoparticles. *Advances in Materials Science and Engineering*. 1: 1-10.

Seo, D.; Jang, Y.; Park, R.; Jung, W. (2012) Immobilization of chitinases from *Streptomyces griseus* and *Paenibacillus illinoisensis* on chitosan beads. *Carbohydrate Polymers*. 88 (1): 391-394.

Vieira, D. C.; Lima, L. N.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Giordano, R.C.; Giordano, R.L.C.; Tardioli, P.

W. (2013) Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochemical Engineering Journal*. 81: 54-64.

Weska, R.; Moura, J.M.; Batista, L.M.; Rizzi, J.; Pinto, L.A.A. (2007) Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 80 (3): 749-753.