

Incorporação da enzima fitase em lipossomos visando aplicação em biossensores para a detecção de ácido fítico

Valquiria C. Rodrigues (PG)¹, Marli L. Moraes (PQ)², Marystela Ferreira(PQ)², Débora Gonçalves(PQ)^{*1}

¹ Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP.

² Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba – SP.

gdebora@ifsc.usp.br.

Palavras Chave: biossensores, lipossomo, imobilização.

Introdução

A imobilização de enzimas em matrizes sólidas tem sido utilizada visando o preparo de sensores enzimáticos para o monitoramento e análise de espécies em solução. Neste trabalho, estudou-se a imobilização da fitase (Fit) em lipossomos. Os lipossomos são conchas esféricas em nanoescala contendo bicamadas lipídicas que encerram uma fase aquosa. Eles são facilmente obtidos, sendo estáveis em solução em relativamente longos períodos de tempo sem que ocorram modificações significativas em seus tamanhos ou estruturas¹. Devido às suas propriedades químicas e físicas, os lipossomos podem ser usados em diferentes campos tal como no encapsulamento de enzimas. As enzimas são consideravelmente mais estáveis quando encapsuladas em lipossomos, pois, desta forma, podem ser protegidas, com eficiência, contra agressões de agentes externos, tais como as proteases. Outra característica importante das enzimas encapsuladas em lipossomos é que elas mantêm as suas atividades enzimáticas, mesmo quando em baixas concentrações².

Neste trabalho, biossensores foram fabricados a partir da imobilização da Fit em filmes de polipirrol (PPI) eletrodepositados em microeletrodos de Pt. A fim de evitar possíveis problemas com a estabilidade enzimática, foi utilizada a técnica de encapsulamento enzimático a partir do uso do lipossomo dipalmitoilfosfatidil glicerol (DPPG). O lipossomo foi preparado dissolvendo-se o fosfolípido em metanol e clorofórmio; depois, os solventes foram removidos por evaporação com nitrogênio até se obter um filme lipídico; este filme foi imerso em uma solução de Fit em tampão acetato de sódio em ultrassom. A caracterização dos filmes foi feita por meio de medidas eletroquímicas, eletroanalíticas e por espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação por polarização (PM-IRRAS).

Resultados e Discussão

Para a imobilização da enzima, foram utilizados dois procedimentos: no primeiro, o eletrodo com o filme de PPI depositado foi imerso em uma solução contendo Fit pura. Ou seja, neste caso a enzima foi imobilizada fisicamente por adsorção. No segundo, o eletrodo foi imerso em uma solução contendo Fit/DPPG. A concentração de enzima, para ambos

os casos, foi de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e os processos foram realizados em uma temperatura controlada de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e um tempo de imobilização de 2 h.

Cronoamperometria foi a técnica utilizada para a detecção de ácido fítico em diferentes concentrações sob um potencial fixo de $0,0 \text{ V}$, escolhido após a otimização dos resultados. A corrente foi monitorada em função do tempo após se adicionar no meio de análise alíquotas sucessivas ($5 \text{ } \mu\text{L}$) de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ácido fítico em $2,0 \text{ mL}$ de tampão acetato ($\text{pH } 5,5$).

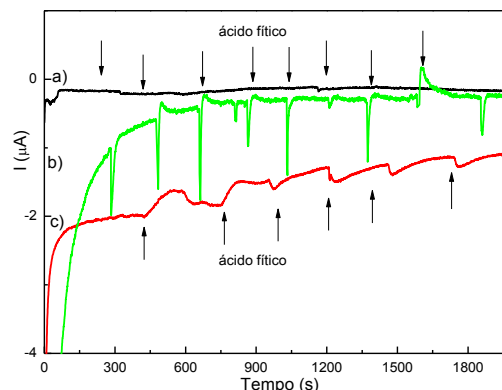


Figura 1. Respostas amperométricas dos filmes sob um potencial fixo de $0,0 \text{ V}$ (vs ECS) em função do tempo. Cada seta indica a adição de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido fítico em $2,0 \text{ mL}$ de tampão acetato para os filmes: a) PPI, b) PPI/Fit e c) PPI/Fit/DPPG.

Conclusões

Os filmes de PPI/Fit e PPI/Fit/DPPG foram empregados com sucesso como biossensores para a detecção de ácido fítico com um custo relativamente baixo. Foram obtidos os valores de limite de detecção de $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ e os valores de faixa linear de trabalho entre $0,5$ a $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,5$ a $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para os filmes de PPI/Fit e PPI/Fit/DPPG, respectivamente. Estes resultados indicam que é vantajoso imobilizar a enzima em DPPG em termos de valores de limite de detecção e faixa linear de concentração.

Agradecimentos

CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

¹ Park W B, Yoon D Y, Kima D S. *Biosensor and Bioelec* 2010, 26

²Walde P, Ichikawa S. *Biomol. Eng.* 2001, 18, 143