

## Imobilização de Lipases em Biofilmes de Sericina para Utilização em Biocatálise

**Ana Carolina de Toledo Santana<sup>1</sup>, Patrícia Salomão Garcia<sup>1</sup>, Franciele Rezende Barbosa Turbiani<sup>1</sup>, Nadia Krieger<sup>2</sup>, Kátia Rasera<sup>2</sup>, Alessandra Machado Baron<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Coordenação de Tecnologia em Processos Químicos  
Rua Marcílio Dias, 635 – CEP 86812-460 Apucarana – Paraná - E-mail: [acarolts1@gmail.com](mailto:acarolts1@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná – Departamento de Química e Bioquímica Caixa Postal  
19081, Centro  
Politécnico CEP 81531-990, Curitiba, Paraná

### RESUMO

*Este trabalho tem como objetivo imobilizar lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em biofilmes de sericina extraída dos casulos do bicho da seda de 2ª classe. Além disso, realizou-se testes de umidade e solubilidade (em *n*-heptano e etanol) do biofilme. Os resultados mostraram que o rendimento da reação, usando a enzima imobilizada, foi 23% de conversão em éster, 25 h. Embora a conversão tenha sido inferior à da enzima livre (100% de conversão em éster, 20 h), o resultado pode ser considerado promissor já que a imobilização não foi otimizada. Com relação à umidade e a solubilidade, o filme possui 20,02% ± 3,53 (m/m) de umidade e 11,84% ± 3,62 (m/m); 3,54% ± 1,17 (m/m) de solubilidade em etanol e *n*-heptano respectivamente. Estes resultados indicam que o filme é pouco solúvel em *n*-heptano, o que o torna aplicável para ser utilizado em meios reacionais contendo solventes pouco polares.*

**Palavras-chave:** Lipases; enzimas; imobilização de lipases; sericina e biofilmes.

### INTRODUÇÃO

Com a evolução nas pesquisas relacionadas à catálise enzimática, desde os mecanismos de catálises das enzimas até o desenvolvimento de biocatalisadores e novas aplicações, uma classe de enzimas que merece destaque em reações de biocatálise é a de lipases. São enzimas que podem catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito<sup>1,2</sup>.

Apesar da alta eficiência das lipases o custo é um fator limitante para a sua utilização em escala industrial. Para minimizar este inconveniente, algumas técnicas estão se desenvolvendo, por exemplo, a imobilização de enzimas que oferecem importantes vantagens em processos industriais e tem sido utilizada extensivamente por facilitar o desenvolvimento de processos em escala comercial. Outra vantagem desta técnica é que proporciona a reutilização das enzimas, facilita a separação dos produtos e aumenta a estabilidade em solventes orgânicos<sup>3</sup>.

A quantidade de resíduos têxteis vem aumentando junto com o crescimento da indústria têxtil, um caso em particular onde é gerado grande quantidade de resíduo é na fabricação da seda. O referido tecido é feito utilizando casulos do "bicho-da-seda" (*Bombyx mori*). Através de

tratamentos químicos é possível extrair a sericina, uma proteína natural presente no casulo, que possui excelentes propriedades antioxidantes, antibacterianas, resistência UV e resistência à umidade<sup>4</sup>. Por possuir propriedades interessantes, filmes de sericina têm sido utilizados para imobilizar enzimas, porém, até o presente momento, não há referências sobre o uso deste material para imobilizar lipases.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é utilizar a sericina, que inicialmente seria um resíduo do processo produtivo, como um suporte biocompatível para imobilização de lipases.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

A sericina foi extraída de acordo com a metodologia proposta por Turbiani<sup>4</sup> dos casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*) de 2<sup>a</sup> classe. A lipase utilizada foi produzida por fermentação submersa pelo LTEB 11 (Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise) na Universidade Federal do Paraná. A imobilização das lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 foi realizada simultaneamente com a produção dos filmes de sericina. Os filmes de sericina foram obtidos pelo processo de "casting process"<sup>7</sup>. O processo consiste na adição da solução filmogênica juntamente com adição da enzima sob agitação e aplicação da mesma em um molde. A solução de sericina 2% (m/v) foi preparada à temperatura ambiente, em água destilada já contendo glicerol (0,6 g glicerol/g sericina). Para obter uma solução homogênea, a solução foi agitada por 1 hora e em seguida a temperatura do sistema foi aumentada para 70° C e lentamente uma solução de dimetilouréia (DMU) (0,8 g/mL) foi adicionada na solução biopolimérica. Ela foi mantida sob agitação magnética durante mais 1 hora e então, após o resfriamento, a solução de lipase a 10% (m/v) foi adicionada e agitada por mais 30 minutos. Por fim, alíquotas de 70 g desta solução foram transferidas para placas de polipropileno (diâmetro = 15 cm) e levadas a uma estufa com circulação de ar, a 30 °C por 16 horas. Os filmes obtidos, foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e utilizados nas reações de esterificação do oleato de etila.

As reações de esterificação foram preparadas em um erlenmeyer de 25 mL contendo 7,0 mL de solvente (heptano), 120 µL de ácido oléico (50 mmol.L<sup>-1</sup>), 62 µL de etanol (150 mmol.L<sup>-1</sup>) a 37 °C e com agitação orbital de 200 rpm<sup>5</sup>. Foram realizadas duas reações de reação, uma usando a enzima liofilizada (livre) e outra com a enzima imobilizada no biofilme. O método para quantificação do éster foi o de Lowry-Tinsley<sup>6</sup>. A atividade (U/g da enzima liofilizada) foi dosada pelo método titulométrico usando a tricaprilina como substrato. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de ácidos graxos (ácido caprílico) por min, a 37 °C. A quantidade de proteína (mg/g da enzima liofilizada) foi dosada pelo método de Bradford. Tanto a atividade, quanto a dosagem de proteínas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da Universidade Federal do Paraná.

Os biofilmes contendo a enzima também foram analisados quanto à umidade e a solubilidade nos solventes etanol e *n*-heptano. No primeiro caso, amostras do biofilme foram pesadas antes e após serem colocadas em estufa a 104 °C por 24 h. Para analisar a solubilidade, os filmes foram cortados em pequenos quadrados (0,5 cm<sup>2</sup>), pesados e adicionados em erlenmeyers contendo 5 mL de cada solvente. Os frascos ficaram sob agitação (200 rpm) por 24 h, à 37 °C. Após este período, os filmes foram transferidos para uma estufa a 104 °C por 24 h. Os cálculos foram baseados nas equações 1 e 2.

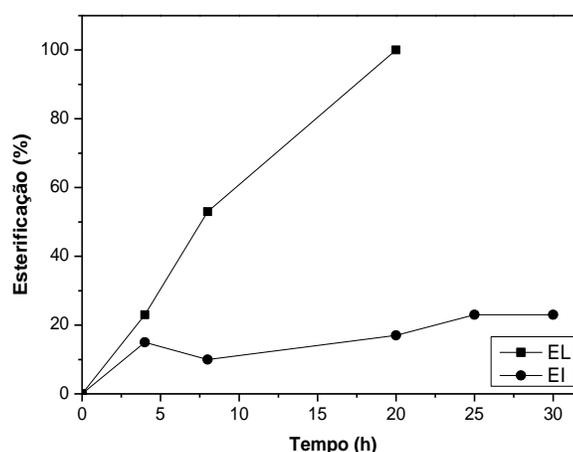
$$\omega = \frac{(m_i - m_f) \cdot 100}{m_i} \quad (1)$$

$$S = \frac{(1 - \omega) - m_f \cdot 100}{m_i(1 - \omega)} \quad (2)$$

Sendo:  $\omega$  (umidade em %);  $m_i$  (massa inicial da amostra em g);  $m_f$  (massa final da amostra em g); S (% de matéria solúvel em solvente).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro teste (Figura 1) mostrou que a enzima imobilizada foi menos ativa (23% de rendimento em éster/ 25h) que a enzima livre (100%/20 h).



**Figura 1** – Esterificação entre ácido oleico e etanol empregando Enzima Livre (EL) e Enzima Imobilizada (EI) como catalisadores. Condições: Razão molar ácido:álcool (1:3); 200 rpm; 10 U de enzima (correspondente a 50 mg de enzima liofilizada); 37°C.

A técnica empregada para a imobilização é definida como entrelaçamento em polímero ou matriz, neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado<sup>4</sup>. Possivelmente, o entrelaçamento acarretou em limitações difusionais intensas, o que pode ter dificultado o acesso dos substratos até a enzima, diminuindo sua eficiência catalítica. Nas próximas imobilizações, será testado o método de adsorção da enzima sobre o filme, que não apresenta este tipo de inconveniente. Outro fator que pode ter contribuído para a perda de atividade enzimática, foi o tempo de secagem do filme em estufa (30°C, 12h), que pode ter provocado a desnaturação da enzima.

Com relação à umidade e solubilidade (tabela 1), os testes indicaram que o filme contendo a enzima apresentou 20% de umidade e foi mais solúvel em etanol quando comparado ao *n*-heptano.

Valores de umidade em média de 15%, foram encontrados por Turbiani (2011), na confecção dos biofilmes de sericina/DMU<sup>4</sup>. O acréscimo de 5% na umidade do filme contendo a enzima pode estar relacionado ao fato de que como a proteína contém grupos hidroxilas, a incorporação de moléculas de água pode aumentar.

**Tabela 2** – Solubilidade do Biofilme contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Solvente	Solubilidade %
Etanol	11,84 ± 3,46
<i>n</i> -heptano	3,54 ± 1,17

Testes realizados em triplicata.

Em relação à maior solubilidade do biofilme em etanol, por ser tratar de um solvente hidrofílico, duas considerações devem ser feitas: a) o etanol pode estar contribuindo para a remoção de água do filme, b) lipases bem como enzimas em geral contém grupos hidrofílicos em sua estrutura, o que pode estar contribuindo para maior interação proteína/solvente

### CONCLUSÕES

Foi possível imobilizar a enzima de *Burkholderia cepacia* LTEB 11 em biofilmes de sericina. Entretanto, os resultados mostraram que a eficiência catalítica foi inferior quando comparado à enzima livre. Outra técnica de imobilização (adsorção) está sendo testada para verificar se é possível aumentar a eficiência catalítica da enzima quando comparada a técnica de imobilização utilizada (matriz).

### REFERÊNCIAS

- (1) BELIVAQUA, J. V. **Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- (2) LIMA, V. M. G. **Produção e purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- (3) SOARES, C. M.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Appl. Biochem. Biotechnol**, p. 77-79, 1999.
- (4) TURBIANI, Franciele Rezende Barbosa. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de sericina e PVA reticulados com dimetiloluréia**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- (5) BARON, Alessandra M; SARQUIS, Maria Inez M.; BAÍGORI, Mario; MITCHELL, Daniel A.; KRIEGER, Nadia A. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium corylophilum* in water-restricted environments. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, 2005.
- (6) LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I.; Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.