

## Imobilização de lipase em filmes biodegradáveis

### Lipase immobilization in biodegradable films

#### RESUMO

Lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 foram imobilizadas em filmes contendo sericina (SS) extraída de casulos do bicho da seda (*Bombyx mori*), amido e álcool polivinílico (PVOH). As lipases imobilizadas foram estudadas quanto à reutilização na síntese do oleato de etila, nas condições reacionais otimizadas anteriormente (49°C; RM ácido:álcool 1:3; 1,25 g de filme contendo 50 U de atividades enzimáticas; 48 h e 150 rpm). Para justificar a reutilização, a enzima livre (sem imobilização) foi utilizada nas mesmas condições reacionais. Os resultados mostraram que a conversão em éster para a enzima livre foi de 68% em comparação com a enzima imobilizada 95%. Foi possível reutilizar o filme contendo as lipases de *B. ribis* imobilizadas por 7 vezes, sendo a última reutilização com taxa de conversão de 50%.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imobilização. Filme biodegradável. Reutilização.

**Michael da Conceição de Castro**  
[mikael2099@hotmail.com](mailto:mikael2099@hotmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Alessandra Machado Baron**  
[alessandrab@utfpr.edu.br](mailto:alessandrab@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Patrícia Salomão Garcia**  
[patriciagarcia@utfpr.edu.br](mailto:patriciagarcia@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Milena Martins Andrade**  
[milenaandrade@utfpr.edu.br](mailto:milenaandrade@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

*Botryosphaeria ribis* EC-01 lipases were immobilized on films containing sericin (SS) extracted from silkworm (*Bombyx mori*), starch and polyvinyl alcohol (PVOH) cocoons. Immobilized lipases were studied for reuse in ethyl oleate synthesis under the previously optimized reaction conditions (49 ° C; RM 1:3 acid:alcohol ; 1.25 g of film containing 50 U of enzymatic activities; 48 h and 150 rpm ). To justify reuse, the free enzyme (without immobilization) was used under the same reaction conditions. The results showed that the conversion to ester for the free enzyme was 68% compared to the immobilized enzyme 95%. It was possible to reuse the film containing the immobilized *B. ribis* lipases 7 times, the last one being reused with 50% conversion rate.

**KEYWORDS:** Immobilization Biodegradable film. Reuse.

#### INTRODUÇÃO

Lipases [Glicerol-éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3)] são enzimas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a clivagem de ligações éster em triglicerídeos e produzindo glicerol e ácidos graxos livres. Em meios não aquosos, catalisam também reações de esterificação dentre outras reações, constituindo uma classe especial de esterases (BORELLI e TRONO, 2015).

Em processos industriais, a utilização de enzimas é determinada principalmente pelos fatores custo, recuperação e estabilidade do catalisador. Nesse sentido, a imobilização de enzimas em suportes que permitam a sua recuperação podendo também contribuir na manutenção ou aumento da estabilidade operacional é uma alternativa que vem sendo estudada a fim de encontrar resultados significativos para os fatores anteriormente citados (BATISTA et al., 2013).

Dentro deste contexto, polímeros ecoamigáveis, ganharam uma importância especial não somente para imobilização de enzimas, mas também na área farmacêutica para liberação de medicamentos por membranas e na engenharia têxtil (WU et.al., 2011). Em se tratando da sericina, obtida de casulos do bicho da seda de 2ª classe, portanto um resíduo, poucos trabalhos são encontrados na literatura, no emprego deste material como suportes para imobilizar enzimas (TOLEDO et al., 2018; MENDES et.al., 2013). O suporte, além de ser biocompatível com a enzima imobilizada, deve possibilitar sua reutilização, permitindo não somente a redução de resíduos gerados, mas também os custos relacionados ao processo.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi imobilizar e reutilizar lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em filmes contendo sericina, em condições previamente estudadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A enzima utilizada neste trabalho é oriunda do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, os processos de produção, extração e semi purificação do extrato bruto foram realizados conforme Andrade (2013). A atividade enzimática (expressa em unidades totais- U) foi medida através da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979).

Para a produção do filme adicionou-se 1,8 g de sericina, 8,1 g de amido de mandioca, 3,9 g de PVOH e 2 mL (2,52 g) de glicerina em 400 mL de água destilada (25°C). A solução foi aquecida a 95 °C por 2 h, alíquotas de 130 mL desta solução foram transferidas para placas de polipropileno (diâmetro = 15 cm) e levadas a uma estufa com circulação de ar (40 °C, 24 h) para posterior formação de um filme por evaporação. Após, os filmes foram recortados sobre placas de Petri de diâmetro 9 cm. Preparou-se 10 mL de solução enzimática com tampão fosfato (pH 8,0; 0,05 mol L<sup>-1</sup>) contendo 30% de isopropanol totalizando 100 U (hidrólise do palmitato de p-nitrofenila-pNPP). Adicionou-se 5 mL da solução lipolítica (contendo 50 U) na parte superior do filme. Após secagem (2 h) a 30°C por evaporação, o filme foi invertido e o restante da solução enzimática (5 mL, 50 U) foi depositada sobre o outro lado do filme. Os filmes foram cortados em pedaços de 4 x 4 mm e armazenados em refrigerador (4°C) para serem utilizados nas reações de esterificação do oleato de etila.

Repetições da reação de esterificação foram realizadas utilizando a mesma preparação de enzima imobilizada. Utilizou-se 1,27 g do filme contendo a lipase imobilizada (50 U), 10 mL de n-heptano, 75 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico e 225 mmol L<sup>-1</sup> de etanol (RM 1:3). O meio reacional foi mantido em agitador orbital a 150 rpm e 49°C, por 6 h (condições otimizadas anteriormente). A dosagem em éster foi realizada pelo método de Lowry-Tinsley (1979). A cada utilização, o biocatalisador era separado do meio reacional por filtração, lavado com n-heptano e seco em dessecador por cerca de 24 h, 25°C. Esse procedimento foi repetido por 7 vezes. O filme contendo a enzima foi pesado a cada reutilização, e o volume do solvente e dos reagentes da reação foram ajustados para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, pois ocorreram pequenas perdas do material no processo. As conversões, após cada reação, foram expressas em relação à conversão obtida no primeiro ciclo.

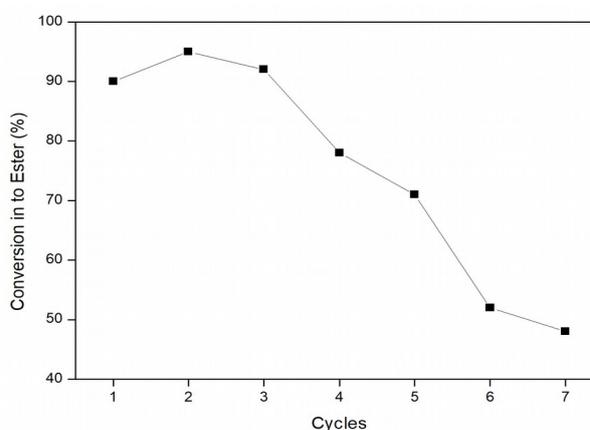
A reação com a enzima livre (liofilizada; não imobilizada, 50 U) foi realizada seguindo as mesmas condições da reação otimizada descrita acima para comparação dos resultados obtidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a conversão em éster para a enzima livre e imobilizada foi 68 e 95% respectivamente. Este resultado pode ser comum para lipases e possivelmente envolve dois fatores: (a) as interações entre a enzima e o suporte podem promover a desagregação da enzima, o que aumenta o número de moléculas de enzima disponíveis para catálise ou (b) a imobilização em suportes hidrofóbicos pode favorecer a catálise devido às interações entre o suporte e a enzima, que mantêm aberta a “tampa” hidrofóbica situada sobre o sítio catalítico das lipases, facilitando o acesso do substrato ao sítio catalítico (PETKAR et al., 2006).

Reações de reutilizações foram realizadas com o filme contendo a enzima imobilizada na síntese do oleato de etila (Figura 1). A lipase imobilizada manteve sua eficiência catalítica até a terceira reutilização (rendimento próximo a 95%) e na 7ª reutilização a conversão em éster reduziu à metade.

Figura 1 – Reutilizações Exemplo de figura



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos de Toledo et al. (2018) que imobilizou lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em filme de Sericina (SS) e Dimetilolureia (DMU). Os referidos autores utilizaram 3 g do filme contendo 11 U (atividade dosada pelo método titulométrico), T: 37 °C, RM: 1:3 (50 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico/150 mmol L<sup>-1</sup> de etanol) em 7 mL de n-heptano, 200 rpm por 30 h. O rendimento em éster foi máximo (95%) nas duas primeiras reutilizações e aproximadamente 60 % na sétima reutilização.

## CONCLUSÃO

Este trabalho procurou contribuir com o gerenciamento eco-amigável de resíduos sólidos (casulos do bicho da seda de 2ª classe) agregando valor ao imobilizar lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em filmes contendo sericina.

O filme contendo sericina mostrou ser um suporte promissor para imobilização de lipases, pois a eficiência catalítica, na síntese do oleato de etila, foi superior quando comparada à enzima livres.

A enzima imobilizada pôde ser reutilizada por três vezes sem perdas na eficiência catalítica atingindo 50% de sua atividade original na sétima reutilização.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M. **Produção e imobilização da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01 e aplicações**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, 2013. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000186248>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

BATISTA, K. A.; LOPES, F. M.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. F. Lipase entrapment in PVA/Chitosan biodegradable film for reactor coatings. **Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl**, v. 33, p. 1696–1701, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112006510?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 ago. 2019.

BORELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 20774-2840, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26340621>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02636814>>. Acesso em: 14 jul. 2019

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; et al. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **React Funct Polym**,

v. 73, p. 160–167, 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381514812002465>>.

Acesso em: 15 ago. 2019.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117706000270>>.

Acesso em: 15 de ago. 2019.

TOLEDO, S. A. C.; et al. Immobilized lipases in sericin–dimethylolurea films as biocatalysts in esterification. **Chemical Papers**, v. 73, n. 3, p. 645-652, 2019.

Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11696-018-0624-2>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

WU, S; LIU, X; YEUNG, A; YEUNG KWK, K.; WU.; et al. Plasma-modified biomaterials for self antimicrobial application. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 3, p. 2851–3286, 2011. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am2003944>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218088/>>. Acesso em: 01 ago. 2019.