

# Imobilização covalente em nanocelulose bacteriana

## *Covalent immobilization in bacterial nanocellulose*

Carolina Stiegler Jurkevicz\*, Renato Márcio Ribeiro Viana†

### RESUMO

As nanoceluloses obtidas por meio da síntese bacteriana melhoram o processo de cicatrização decorrente das suas propriedades físico-químicas como a afinidade biológica e a possibilidade de ser modelada em diferentes estruturas. A associação dessa com a papaína traz diversos benefícios, já que a papaína possui propriedade bactericida, bacteriostática e aceleradora de crescimento tecidual. O presente trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da enzima na nanoceluloses, acoplando primeiramente o anidrido succínico (agente espaçador) na membrana e em seguida implementando a papaína, para realizar a caracterização foi utilizada a espectroscopia de infravermelho e o método de caracterização de proteína de Bradford. Os resultados obtidos nos espectros de infravermelho obtiveram sucesso pelo fato de ser possível observar as bandas de éster e amida, em relação ao método de Bradford verificou-se que o ponto de absorção da nanocelulose era menor que o primeiro ponto da curva padrão, entretanto, a proteína acoplada a nanocelulose apresentava absorção no valor de 0,533. Concluiu-se que os acoplamentos obtiveram sucesso, decorrente de que os espectros obtidos e no método de Bradford observou-se a absorção de proteína acoplada na nanocelulose.

**Palavras-chave:** Papaína. Imobilização. Nanocelulose

### ABSTRACT

The nanocelluloses obtained through bacterial synthesis improve the healing process due to its physicochemical properties such as biological affinity and the possibility of being modeled in different structures. The association of this with papain brings several benefits, since papain has bactericidal, bacteriostatic and tissue growth accelerator properties. The present work aimed to study the immobilization of the enzyme in nanocelluloses, first coupling the succinic anhydride (spacer agent) in the membrane and then implementing the papain, to perform the characterization it was used the infrared spectroscopy and the Bradford method of protein characterization. The results obtained in the infrared spectra were successful because it was possible to observe the ester and amide bands. In relation to the Bradford method, it was verified that the absorption point of the nanocellulose was lower than the first point of the standard curve, however, the protein coupled to the nanocellulose had an absorption value of 0.533. It was concluded that the couplings were successful, because the spectra obtained and the Bradford method observed the absorption of protein coupled to nanocellulose.

**Keywords:** Papain. Immobilization. Nanocellulose

---

\* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; [carolina.sj@outlook.com](mailto:carolina.sj@outlook.com)

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina; [renatoviana@utfpr.edu.br](mailto:renatoviana@utfpr.edu.br)



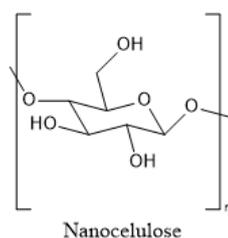
## 1 INTRODUÇÃO

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de  $\beta$ -Dglicopiranosose unidas em cadeias longas não ramificadas, com ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). (KLEMM et al., 2005). É considerada um dos polímeros biodegradáveis mais disponíveis na natureza, podendo ser também sintetizada por algumas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. (FISCHER et al., 2017).

A nanocelulose bacteriana pode ser aplicada em diversas áreas por possuir propriedades físico-químicas, propriedades como capacidade de reter água, resistência à tração e rigidez, cristalinidade, porosidade, formação de uma rede de nanofibras, afinidade biológica e a possibilidade de ser modelada em diferentes estruturas tridimensionais por meio de seu modo de cultivo (YAN et al., 2008).

A nanocelulose bacteriana possui um grupo hidroxila livre ligado ao carbono 6 (C6) como é exposto na Figura 1, sendo essa a única primária e, portanto, a mais reativa, tal agrupamento possibilita por reação química, a introdução de outras estruturas. A adição de proteínas à membrana de celulose é possível pela substituição da hidroxila por um ácido carboxílico, que possibilitará a ligação com o grupamento amina das proteínas. No presente trabalho, as membranas de celulose bacteriana foram modificadas através da incorporação de um “linker” (espaçador), o anidrido succínico, afim de incorporar função de ácido carboxílico, possibilitando a reação química com a amina presente na proteína (papaína).

Figura 1 – Estrutura da nanocelulose bacteriana.



Fonte: Próprio autor (2020)

A papaína é uma enzima proteolítica complexa de origem vegetal extraída do látex do mamão (*Carica papaya*), sendo utilizada no auxílio dos processos de cicatrização decorrente da sua propriedade de acelerar o crescimento tecidual, bactericida, bacteriostático e o debridante de tecidos necrosados, desvitalizados e infectados. Outros fatores que proferem a favor do seu uso é o baixo custo, a facilidade de aplicação e sua ação similar à de desbridamentos químicos auto líticos (DE BRITO JUNIOR & DE LUCENA FERREIRA, 2015).

O desbridamento químico caracteriza-se por provocar, em doses diminutas, a proteólise, isto é, a dissociação de uma quantidade importante de proteínas em moléculas mais simples, e finalmente, em aminoácidos. Seu uso promove ainda a liquefação da secreção purulenta, ativando o processo de regeneração tecidual e encurtando o período de cicatrização (SOUZA, FRANCO, OLIVEIRA, & SOUZA, 2017).

A papaína (enzima proteolítica) possui a capacidade de quebrar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, dessa forma realizam processos biológicos essenciais como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas como pomadas cicatrizantes pelo fato de hidrolisar as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando assim a sua absorção pelas células. (ORAL, 2017).



Portanto, pelo fato de a papaína poder provocar a proteólise e conseqüentemente realizar a regeneração tecidual, o presente trabalho pretende verificar a atividade dessa enzima quando aplicada em nanocelulose bacteriana visando trazer uma maneira mais rápida de cicatrização e uma alternativa as pomadas cicatrizantes, pelo fato de possibilitar vantagens sobre os tratamentos condicionais.

Uma vez que as celuloses bacterianas tem como suas principais propriedades o controle da dor e inflamação, manutenção de umidade na ferida, assim como dos fatores de crescimento e defesa, favorece a granulação e crescimento dérmico, possui menor taxa de contaminação externa, diminui as trocas de curativos, diminuindo lesões epidérmicas com comodidade e segurança ao paciente (VIEIRA et al., 2007). A celulose bacteriana apresenta uma maior cristalinidade, maior capacidade de retenção de água quando comparado à celulose de origem vegetal (BRISOLA & TISCHER, 2016). Portanto, o presente trabalho visa imobilizar a protease na nanocelulose bacteriana e caracteriza-la por meio do método de Bradford e do ensaio enzimático;

## 2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

Antes de realizar a imobilização em nanocelulose foi testado o acoplamento em membrana de celulose bacteriana, realizou-se os mesmos processos descritos abaixo (todos os espectros de infravermelho realizados nas amostras de acoplamento com anidrido succínico e com a papaína obtiveram sucesso), como também o ensaio enzimático para avaliar a atividade da enzima na membrana.

Posteriormente ao acoplamento da papaína com a membrana, realizou-se a atividade enzimática que é determinada a partir da liberação de tirosina no ensaio enzimático. Essa é liberada quando a caseína é digerida pela protease. A tirosina liberada foi quantificada pelo reagente Folin & Ciocalteus Phenol, esse reage principalmente com a tirosina livre produzindo um cromóforo de cor azul, quantificável e medido através do valor de absorbância no UV-Vis.

Primeiramente foi gerado uma curva padrão de tirosina ( $\mu\text{mols} \times \text{Abs}$ ) a partir de uma faixa de concentração e, em seguida, submeteu-se as amostras do ensaio enzimático no UV-Vis para verificar a sua absorbância e conseqüentemente a atividade enzimática, dessa forma, gerou-se uma curva de absorbância da tirosina a partir da protease da papaína.

Na etapa da imobilização da enzima é necessário o uso de um espaçador ligado a membrana para que ocorra o acoplamento, decorrente disso, no presente trabalho foi utilizado o anidrido succínico como espaçador decorrente do seu custo ser baixo, por permitir a realização de ligação do tipo éster e amida em ambos os lados e por não ser maléfico ao meio ambiente.

Primeiramente foi sintetizado o anidrido succínico a partir do anidrido acético e o ácido succínico, e em seguida temos o acoplamento do anidrido succínico à nanocelulose formando um éster.

Síntese do anidrido succínico: Em um balão de fundo redondo de 25ml adicionou-se 5g de ácido succínico e 8mL de anidrido acético, mantendo a temperatura de 110°C, a partir do momento em que a mistura se tornou uma solução límpida contou-se uma hora para depois ser retirada e filtrada. Após a secagem da amostra foi constatado um rendimento de 69,25% do anidrido succínico;

Acoplamento do anidrido succínico na nanocelulose: Adicionou-se no balão de fundo redondo 22mg de nanocelulose, 0,08g do anidrido succínico, 5mL do diclorometano e 180 $\mu\text{L}$  da piridina. Em seguida faz-se uma condensação pelo condensador de refluxo durante 22 horas na temperatura de 45°C e sob constante agitação;

Acoplamento da papaína na nanocelulose: Adicionou-se em um balão volumétrico 0,0045g de nanocelulose acoplada ao anidrido com 0,032g de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), 0,02g de NHS (N-Hidroxisuccinimida) e 3ml de água destilada, em seguida levou-se à agitação com um agitador magnético por cerca de 3 horas. Ao término, a nanocelulose foi levada a centrifuga por 2min e em seguida o decantado foi submetido a uma agitação no balão volumétrico por 22 horas que continha 7ml de água destilada e 1g de papaína. A nanocelulose já acoplada à papaína foi lavada 3x com água destilada por 5min e levada



para secagem. Ao final foi realizado o controle negativo utilizando as mesmas condições acima na ausência do agente de acoplamento EDC;

Síntese do Reagente de Bradford: Adicionou-se 0,01g de G-250 em um balão volumétrico de 250ml juntamente com 5ml de etanol 95% e 10mL de ácido fosfórico 85%, em seguida completou-se com água destilada até o volume de 250ml;

Curva Padrão: Adicionaram-se diferentes volumes de água destilada conforme a Tabela 1, diferentes volumes de uma solução de BSA (1mg/ml) e 2,5ml do reagente de Bradford em cada tubo de ensaio. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise de ultravioleta em 595nm usando como branco a água destilada;

Tabela 1 – Volumes adicionados nos tubos para curva padrão

Tubos	1	2	3	4	5	6
Água	100uL	90uL	80uL	70uL	60uL	50uL
BSA	0uL	10uL	20uL	30uL	40uL	50uL
Volume total	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL
BG-250	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL

Fonte: Próprio autor (2020).

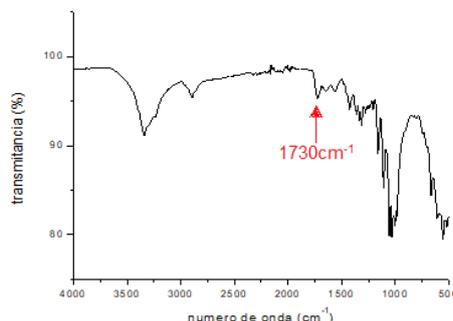
Quantificação da proteína: Em um tubo de ensaio adicionou-se a nanocelulose acoplada a papaína juntamente com 1ml de NaOH (0,1 mol/L, pH=12), para que fosse realizado a hidrólise da papaína, em seguida o tubo foi submetido a banho de ultrassom por 2 horas. Em um novo tubo de ensaio adicionou-se 0,05ml da amostra hidrolisada e 2,5ml do reagente de Bradford, em seguida foi levado para o ultravioleta em 595nm usando como branco a solução de 800µL de água destilada e 200µL do reagente de Bradford.

### 3 RESULTADOS

Primeiramente foi realizado o acoplamento da papaína na membrana para que em seguida pudesse ser realizada a sua caracterização, a partir dos resultados da curva padrão de tirosina foi possível calcular a atividade enzimática, que possuía um valor de 0,3727 U/ml (sendo U referente a unidades de enzima), portanto, concluiu-se que a enzima apresentava atividade enzimática. Optou-se por repetir os processos usando a nanocelulose por apresentar uma superfície de contato maior que a membrana e dessa forma ser possível comparar os valores de atividade enzimática.

Após cada etapa as amostras foram submetidas a espectroscopia do infravermelho para verificar se o acoplamento obteve sucesso, na Figura 2 temos o espectro de infravermelho referente ao acoplamento do anidrido succínico a nanocelulose.

Figura 2 – Espectro do Infravermelho referente a reação entre anidrido succínico e a nanocelulose.

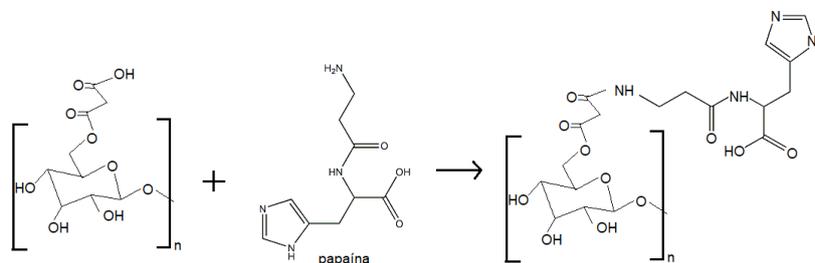


Fonte: Próprio autor (2020).

No espectro da Figura 2 é possível perceber uma banda em  $1730\text{cm}^{-1}$  (C=O) que associada com a banda presente entre  $1290\text{-}1180\text{cm}^{-1}$  (C-O-C) é um indicativo da presença da função éster, dessa forma, pode-se concluir que o anidrido está acoplado a nanocelulose. Dessa forma, a adição de proteínas a nanocelulose se torna possível pois a substituição da hidroxila por um ácido carboxílico possibilita a ligação com o grupamento amina das proteínas.

Posteriormente ao acoplamento do anidrido, a papaína foi implementada a nanocelulose succínica (Figura 3) com o auxílio do EDC e do NHS que atuam como agentes de ativação da carboxila para o acoplamento de aminas primárias para produzir ligações amida, já que a papaína possui um grupamento de amina primária.

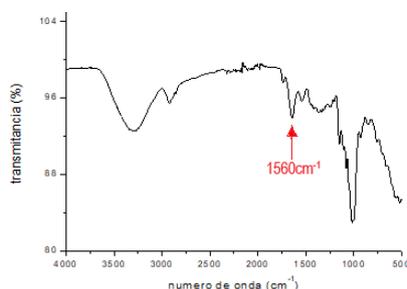
Figura 3 – Acoplamento da papaína na nanocelulose succínica.



Fonte: Próprio autor (2020).

Através do espectro na Figura 4 é possível observar que houve sucesso no acoplamento da proteína na nanocelulose, pois tem-se a presença de uma banda em  $1560\text{cm}^{-1}$  (NH) associada com as bandas de absorção entre  $1680\text{-}1640\text{cm}^{-1}$  (C=O) e entre  $3440\text{-}3420\text{cm}^{-1}$  (N-H) que é um indicativo da presença de amida secundária (-CONHR) na amostra analisada.

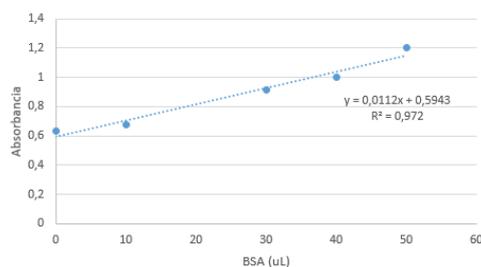
Figura 4 – Espectro do Infravermelho referente a reação entre o éster e a amina da proteína.



Fonte: Próprio autor (2020).

Após realizar a análise da espectroscopia do infravermelho é fundamental quantificar essa proteína e determinar sua atividade enzimática. Para realizar a quantificação da proteína o método de Bradford foi selecionado devido ser uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Os valores das absorbâncias dos tubos de ensaio submetidos ao UV-Vis são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Curva padrão para o método de Bradford



Fonte: Próprio autor (2020).

Posteriormente, a nanocelulose com papaína deve ser hidrolisada, pois o método de bradford identifica somente as proteínas solúveis, quando suas unidades de aminoácidos se encontram separadas um das outras, isso ocorre facilmente através da reação em um meio alcalino decorrente das ligações ésteres presentes que são sensíveis a esse meio, nesse caso foi utilizado o hidróxido de sódio.

Depois de hidrolisada, a proteína reagiu com o reagente de Bradford e foi submetida ao UV-Vis, resultando em um valor de 0,533 de absorbância, sendo utilizado como branco a solução de 800μL de água destilada e 200μL do reagente de Bradford.

Analisando o valor de absorbância da amostra de nanocelulose é possível perceber que o ponto é menor que o primeiro ponto (0,6 de absorbância) da curva padrão (Figura 5). Dessa forma, se faz necessário refazer a quantificação da proteína alterando o branco da curva padrão e aumentando o número de pontos para que tenhamos diferentes concentrações.

## 4 CONCLUSÃO



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um  
mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação  
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica  
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



CAMPUS GUARAPUAVA

Pode-se concluir pelo presente trabalho que se tem indícios de que a papaína está acoplada a nanocelulose decorrente dos espectros de infravermelhos expostos e pela amostra apresentar absorbância quando se realizou o método de caracterização de proteína de Bradford. Posteriormente deve ser realizado e análise do controle negativo na técnica de espectroscopia de infravermelho, ser refeito o método de Bradford alterando o branco da curva padrão, realizar os ensaios enzimáticos para determinar qual a atividade enzimática da protease e realizar os testes de TG.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Renato Viana pela oportunidade de participar desse projeto de pesquisa e por todo conhecimento que tenho adquirido, agradeço também a CAPES pela bolsa e auxílio financeiro que possibilitou total dedicação a iniciação científica.



## REFERÊNCIAS

- BAILAK, M., & SALLES JR, G. **Membrana porosa de celulose no tratamento de queimaduras**. Arquivos Catarinenses de Medicina, 2007.
- BRISOLA, J., & TISCHER, A. C. **Comparação de celulose e nanocelulose bacteriana produzidas em diferentes substratos**. In: II Congresso Paranaense de Microbiologia – Simpósio Sul-americano de Microbiologia Ambiental. Campinas, GALOÁ, 2016.
- DE BRITO JUNIOR, L. C., & DE LUCENA FERREIRA, P. **Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína**. Medicina (Brasil), 2015.
- FISCHER, M. R., GARCIA, M. C. F., NOGUEIRA, A. L., PORTO, L. M., SCHNEIDER, A. L. DOS S., & PEZZIN, A. P. T. **Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos**. Revista Materia. 2017.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. **Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- ORAL, U. S. O. **Protease Enzima que hidrolisa proteínas**. 2017.
- SOUZA, M. C. A. DE, FRANCO, R. O. M., OLIVEIRA, P. S. C. DE, & SOUZA, E. R. P. **Úlcera crônica tratada com gel de papaína 10% na Estratégia Saúde da Família: relato de experiência**. Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, 2017.
- VIEIRA, J. C., BADIN, A. Z. D., CALOMENO, L. H. A., TEIXIERA, V., OTTONOBI, E., YAN, Z.; CHEN, S.; WANG, H.; WANG, B.; JIANG, J. (2008). **Biosynthesis of bacterial cellulose / multi-walled carbon nanotubes in agitated culture**. Carbohydrate Polymers, v. 74, p. 659–665, 2008.