



Biofilmes para imobilização de lipase

Biofilms for lipase immobilization

Lucas Rodrigues Oliveira*, Alessandra Machado Baron[†],

Thandara Cristina Aguiar[‡], Valéria Marta Gomes do Nascimento[§], Patrícia Salomão Garcia[¶]

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a produção de filmes biodegradáveis para a imobilização de lipases. Foram estudados dois tipos de filmes, um contendo amido de milho e álcool polivinílico (AM-PVOH) e outro contendo amido de milho e κ -carragena (AM-PVOH-C). Os filmes foram produzidos por *casting* e caracterizados quanto à espessura e solubilidade em *n*-hexano. A lipase de *Burkholderia lata* foi imobilizada por adsorção sendo a eficiência de imobilização e a retenção da atividade calculada pela hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). Os filmes apresentaram espessura entre 200 e 260 μm sendo a solubilidade menor ($5,82 \pm 0,82\%$) para o filme AM-PVOH, quando comparada com a solubilidade do filme com κ -carragena ($11,60 \pm 3,61\%$). A atividade da lipase após a imobilização foi de $0,79 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$ para a lipase imobilizada AM-PVOH e $0,77 \pm 0,008 \text{ U mg}^{-1}$ para o filme AM-PVOH-C, sendo a eficiência de imobilização acima de 90% para os dois filmes. Houve ativação da enzima, pois a retenção foi acima de 100% para ambos os filmes. Os filmes podem ser considerados como suportes promissores na imobilização enzimática.

Palavras-chave: lipase, imobilização, amido, κ -carragena.

ABSTRACT

The objective of this work was the production of biodegradable films for lipase immobilization. Two types of films were studied, one containing corn starch and polyvinyl alcohol (AM-PVOH) and the other containing corn starch and κ -carrageenan (AM-PVOH-C). The films were produced by casting and characterized for thickness and solubility in *n*-hexane. Lipase from *Burkholderia lata* was immobilized by adsorption and the immobilization efficiency and activity retention were calculated by hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP). The films had a thickness between 200 and 260 μm and the solubility was lower ($5.82 \pm 0.82\%$) for the AM-PVOH film, when compared to the solubility of the film with κ -carrageenan ($11.60 \pm 3.61\%$). The lipase activity after immobilization was $0.79 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$ for the immobilized lipase AM-PVOH and $0.77 \pm 0.008 \text{ U mg}^{-1}$ for the AM-PVOH-C film, being the efficiency of immobilization above 90% for both films. There was enzyme activation as retention was above 100% for both films. Films can be considered as promising supports for enzymatic immobilization.

Keywords: lipase, immobilization, starch, mycelium, κ -carrageenan.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são amplamente utilizadas em vários setores, como indústria de alimentos, fabricação de papel, produtos lácteos, indústrias de detergentes e couro, indústria farmacêutica (ibuprofeno, naproxeno),

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; Lucas.2018@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; alessandrab@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Assis, São Paulo, Brasil; valeria@assis.unesp.br

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; p.salomaogarcia@gmail.com



cosméticos, hidrólise de gorduras e óleos e síntese de detergentes biodegradáveis, produtos agrícolas (pesticidas e insetos), surfactantes e combustíveis (RAFIEE e REZAE, 2021).

Apesar do alto potencial das lipases, suas aplicações em geral são limitadas devido ao fato de que as enzimas na forma livre têm natureza instável e vida útil curta (KUO et al., 2012). Eles são muito sensíveis ao meio ambiente condições de reação, tais como pH e temperatura e podem sofrer desnaturação sob essas condições. Além disso, as enzimas na forma livre tendem a formar agregados, possuem baixa possibilidade de recuperação e reutilização (BILAL, 2021). Portanto, o uso de enzimas imobilizadas é um dos melhores métodos para superar esses problemas (PENCREAC'H et al, 1997; KATCHALSK-KATZIR, 1993; TELEFONCU et al., 1990).

Dentre as características importantes de um suporte para imobilizar enzimas estão a não toxicidade, alta capacidade de carga, porosidade e área superficial elevada, alta biocompatibilidade, alta afinidade por proteínas, biodegradabilidade, solubilidade, flexibilidade para preparação em diferentes configurações geométricas, a fim de contribuir com permeabilidade ao sistema, capacidade de preservar os sítios enzimaticamente ativos, resistência a contaminações bacterianas, disponibilidade, baixo custo e ser ecologicamente correto (GÓRECKA et al., 2011; KRAJEWKA, 2004). A utilização de biopolímeros vem ganhando uma posição de destaque nos últimos anos devido às suas características únicas, incluindo não toxicidade, biodegradabilidade, excelente afinidade por proteínas (HORCHANI et al., 2012; TISCHER et al., 1999), além de serem renováveis e abundantes.

Tendo em vista a preocupação com a utilização de suportes ecoamigáveis, o objetivo deste trabalho foi produzir suportes biodegradáveis, na forma de filmes contendo amido, álcool polivinílico e κ -carragena, para imobilizar lipases de *Burkholderia lata*. Não há relatos na literatura, até o momento, envolvendo estudos com a utilização de suportes biodegradáveis contendo a blenda citada. O amido compreende estruturas de amilose linear e amilopectina ramificada. A amilose (105 g/mol) é composta por unidades α -1,4 de glicose. Essa porção suporta a capacidade de formação de filme. A amilopectina (106-107 g/mol) é formada por unidades de glicose α -1,4 ligadas por ligações β -1,6. A alta massa molecular da amilopectina reduz a mobilidade das cadeias poliméricas em solução, resultando em uma alta viscosidade. Grupos hidroxila no amido são responsáveis pelas ligações H que mantêm as cadeias de amido juntas, promovendo a insolubilidade aquosa. O amido termoplástico (TPS) é formado à medida que os grânulos de amido são gelatinizados com um plastificante (como glicerol) em excesso de água a temperaturas entre 60 e 100 °C. O álcool polivinílico é um polímero sintético solúvel em água e com excelente capacidade de formação de filmes, poder emulsificador e adesivo. A κ -carragena tem uma estrutura linear sulfatada, ou seja possui cargas negativas, obtida a partir da alga vermelha. É composta de unidades D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligados por ligações α -1,3 e β -1,4-glicosídicas (BARIZÃO et al., 2020). As cargas negativas da κ -carragena podem auxiliar na imobilização por adsorção iônica, tornando a interação enzima-suporte mais forte em comparação à adsorção física.



2 MÉTODO

2.1 Produção e caracterização dos filmes

Os filmes foram produzidos adicionando 150,4 mL de água destilada em um béquer de 500 mL e dissolvendo 1,6 mL de glicerol com agitação magnética. Após, foram adicionados os polímeros, com uma mistura a seco, 1,6 g de ácido polivinílico (PVOH) e 4,8 g de amido de milho. Para os filmes de κ -carragena (AM-PVOH-C) adiciona-se 1,6 g de carragena aos polímeros. Após a total adição, a mistura foi mantida sob agitação por 20 minutos, sem aquecimento. Após este tempo a solução foi aquecida até 90°C e mantido nesta temperatura por 30 minutos, com agitação constante. Após o término do aquecimento a solução foi dividida igualmente em duas placas de Petri (diâmetro de 150 mm) e levadas para a estufa com circulação de ar à 40°C por 16 horas.

Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, utilizando um micrômetro digital eletrônico (0-25 mm com resolução de 0,001 mm/YST, modelo tech/YUANLS-H4024). Dez medições aleatórias foram realizadas nos filmes, usando áreas de aproximadamente 9,6 cm²/3,5 cm de diâmetro.

A solubilidade dos filmes foi realizada em *n*-hexano, solvente apolar, pois durante o procedimento de imobilização o filme necessita ser enxaguado para remover as lipases não adsorvidas. Entretanto, estes filmes possuem alta solubilidade em água (BARIZÃO et al., 2020) e por isso utilizou-se um solvente apolar a fim de minimizar este inconveniente. Os filmes cortados em quadrados (1 x 1 cm) foram pesados (0,30 gramas por teste), colocados em placas de Petri, e levados para a estufa a 103°C por 24 horas. Após, os filmes foram pesados (0,05 g) e transferido para um erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de *n*-hexano e levado ao shaker a 25°C, 100 rpm por 24 horas. Os filmes foram separados por filtração simples e levados a estufa a 103°C por 24 horas. Os filmes foram pesados e a solubilidade (S) foi calculada a partir da equação 1.

A solubilidade (S) foi calculada pela Eq. (1):

$$S = \frac{M_0 - M_f}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde M_0 : massa inicial (sem umidade); M_f : massa final (após o contato com o solvente *n*-hexano).

2.4 Imobilização de Lipases

Para a imobilização, os filmes foram recortados em uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro, 4 mL de uma solução enzimática (lipase de *Burkholderia lata*), preparada em tampão fosfato pH 7, 0,05 mol L⁻¹ contendo 30% de isopropanol, foi depositada sobre a superfície do filme e levado a estufa por 1 hora e 30 minutos (40°C). Após, foi adicionado mais 4 mL do outro lado do filme e levado para a estufa novamente por 1 hora e 30 minutos (40°C). Após a secagem total, o filme foi enxaguado com 3 mL de *n*-hexano para remover as lipases não adsorvidas, após secagem à temperatura ambiente por 2 h o filme foi cortado em quadrados de 0,5x0,5 cm e armazenados a 4°C. Após evaporação do *n*-hexano à temperatura ambiente (2 h), o recipiente foi enxaguado com solução tampão pH 7, 0,05 mol L⁻¹ e a atividade enzimática deste sobrenadante foi determinada.

A eficiência de imobilização (E) foi obtida pela Eq. (2) e a retenção de atividade (R) foi obtida pela Eq. (3):



$$E\% = \frac{(A_{ti} - A_{ts}) \cdot 100}{A_{ti}} \quad (2)$$

$$R\% = \frac{A_0 \cdot 100}{A_T} \quad (3)$$

Onde:

A_{ti} : atividade total da solução enzimática antes da imobilização frente *p*NPP (U);

A_{ts} : atividade total da solução enzimática após a imobilização (sobrenadante) frente o *p*NPP (U);

A_0 : atividade experimental observada da enzima imobilizada (U mg⁻¹ de suporte);

A_T : atividade teórica da enzima imobilizada (U mg⁻¹ de suporte).

A atividade teórica foi calculada através da Eq. (4):

$$A_T = \frac{A_{ti} - A_{ts}}{m} \quad (4)$$

Onde m: massa do suporte (mg) usada no processo de imobilização.

2.5 Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade das soluções enzimática, antes e após a imobilização e atividade das enzimas imobilizadas, foi utilizado o método de hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979). Para a atividade das soluções utilizou 0,9 mL de meio reacional, preparado a partir da mistura de 0,1 mL da solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila em 1 mL de isopropanol) com 0,9 mL solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0). Aos 0,9 mL do meio reacional, adicionou-se 0,1 mL de tampão (para o branco) ou 0,1 mL da solução enzimática para as amostras. A reação foi acompanhada em cubeta de 1 mL em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS), por 1 minuto (40°C, 410 nm). A atividade foi calculada conforme a Eq. 5. A unidade foi definida como (U mL⁻¹), onde U é 1 μmol de *p*NPP produzido por minuto por mL da solução enzimática.

$$Atividade = \frac{CA \cdot FD}{\epsilon \cdot V} \quad (5)$$

Onde CA: coeficiente angular da reta (Abs x tempo em min); FD: fator de diluição; ϵ : coeficiente de extinção molar para tampão fosfato pH 8: 1,5.10⁴ (L mol⁻¹ cm⁻¹); V: volume da solução enzimática (mL).

Para a atividade da enzima imobilizada usou-se 5 mL de meio reacional e aproximadamente 1 mg da enzima imobilizada, a reação ocorreu em erlenmeyer de 25 mL em banho Maria (40°C) e retiradas alíquotas a cada minuto, por 5 minutos, para leitura em espectrofotômetro (410 nm). A atividade foi calculada conforme Eq. 6. A unidade foi definida como (U mg⁻¹), onde U é 1 μmol de *p*NPP produzido por minuto por miligrama de filme contendo lipase.

Os ensaios foram realizados em triplicatas.

$$Atividade = \frac{CA \cdot V}{\epsilon \cdot M_a} \quad (6)$$

Onde CA: coeficiente angular da reta; V; volume do meio reacional (mL); ϵ : coeficiente de extinção molar para tampão fosfato pH 8: 1,5.10⁴ (L mol⁻¹ cm⁻¹); M_a : massa da enzima imobilizada (mg).



3 RESULTADOS

A espessura dos filmes ficou entre 200 e 260 μm e a solubilidade em *n*-hexano foi menor ($5,82 \pm 0,82\%$) para o filme AM-PVOH, quando comparada com a solubilidade do filme com κ -carragena ($11,60 \pm 3,61\%$). Este teor pode ser considerado baixo quando comparado à solubilidade do mesmo filme em água (próxima de 60%) (BARIZÃO et al., 2021). A baixa solubilidade do filme em *n*-hexano permitiu a adaptação do processo de imobilização enzimática. Após a imobilização, é importante que o suporte (filme) seja enxaguado para remover as enzimas que ficaram adsorvidas fracamente ou que não foram adsorvidas.

A eficiência de imobilização, a atividade teórica e a observada estão na tabela 1. Observa-se que a atividade da lipase de *B. lata* após a imobilização foi de $0,79 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$ para a lipase imobilizada AM-PVOH e $0,77 \pm 0,008 \text{ U mg}^{-1}$ para o filme AM-PVOH-C, sendo a eficiência de imobilização acima de 90% para os dois filmes. A retenção da atividade (R) foi acima de 100% para ambos os filmes, indicando ativação da enzima após a imobilização.

Tabela 1 – Eficiência de Imobilização (E%), A_T , A_O e Retenção de Atividade (R%).

Suporte	E%	$A_T (\text{U mg}^{-1})$	$A_O (\text{U mg}^{-1})$	R%
AM-PVOH	94	0,088	$0,79 \pm 0,01$	890
AM-PVOH-C	98	0,10	$0,77 \pm 0,008$	770

Fonte: Autoria própria (2021)

A κ -carragena possui cargas negativas (grupos sulfatos) em sua estrutura, para haver uma imobilização por adsorção iônica, é necessário conhecer o ponto isoelétrico (PI) da lipase utilizada neste trabalho (*B. lata*) e adequar a solução tampão onde a enzima é preparada de forma que a carga residual seja contrária à carga da κ -carragena. Entretanto, como o PI da referida lipase não foi determinado, investigou-se o PI de outra lipase semelhante (*B. cepacia*; PI de 6,0) (PADILHA, 2010). Ou seja, para tais lipases adquirirem uma carga residual positiva, precisam estar preparadas em tampão com pH abaixo de 6,0. No caso da imobilização da *B. lata* (nosso trabalho), a solução enzimática, foi preparada em pH 7,0, sendo possível que as interações enzima-suporte tenham ocorrido por adsorção física para os dois tipos de filme. Isto justificaria a semelhança nos resultados obtidos. Por isso, em ensaios futuros, será investigada a imobilização, preparando a solução enzimática em pH 5,0.

4 CONCLUSÃO

Foi possível imobilizar lipases de *B. lata* em biofilmes, com ativação após a imobilização, por isso estes estudos terão continuidade a fim de verificar outros parâmetros que interfiram na imobilização da *B. lata*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR-Apucarana (LAMAP), pela utilização do Espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent).



REFERÊNCIAS

- KUO, C.H.; LIU, Y.C; CHAND, C.M.J; CHEN, J.H; CHANG, C, SHIEH, C.J. **Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles.** Carbohydr. Polym., 2012.
- BILAL, MUHAMMAD; IQBAL, H.M. **Armoring bio-catalysis via structural and functional coordination between nanostructured materials and lipases for tailored applications.** Int. J. Biol. Macromol., 2021.
- KATCHALSK-KATZIR, Ephraim. **Immobilized enzymes—learning from past successes and failures,** Trends Biotechnol., 1993
- TELEFONCU, A.; DLNCKAYA, E.; VORLOP, K.D. **Preparation and characterization of pancreatic lipase immobilized in Eudragit-matrix.** Appl. Biochem. Biotechnol., 1990.
- PENCREAC'H, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J.C. **Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*,** Biotechnol. Bioeng. 1997.
- KRAJEWSKA, B. **Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review.** Enzym. Microb. Technol., 2004.
- GÓRECKA, E.; JASTRZAEBKS, M. **Immobilization techniques and biopolymer carriers.** Biotechnol. Food Sci., 2011.
- HORCHANI, H.; AISSA, I.; OUETANI S.; ZARAI, Z.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. **Staphylococcal lipases: biotechnological applications.** J. Mol. Catal. B Enzym., 2012.
- TISCHER, W.; WEDEKINF, F. **Immobilized enzymes: methods and applications, Biocatalysis-from discovery to application.** Topics in Current Chemistry, 1999.
- BARIZÃO, Camila de Lima; CREPALDI, Marina I.; JUNIOR, Oscar de Oliveira S.; OLIVEIRA, Ariel C.de; MARTINS, Alessandro F.; GARCIA, Patricia S.; BONAFÉ, Elton G. **Biodegradable films based on commercial κ-carrageenan and cassava starch to achieve low production costs.** International Journal of Biological Macromolecules, 2020.
- PADILHA, Giovana da Silva. **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia*.** 2010. 126 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266999>>. Acesso em: 12 set. 2021.
- 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.