

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
LICENCIATURA EM QUÍMICA

MICHAEL CONCEIÇÃO DE CASTRO

PRODUÇÃO DE BIOFILMES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA
2020

MICHAEL CONCEIÇÃO DE CASTRO

PRODUÇÃO DE BIOFILMES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química

Orientadora: Dr^a. Alessandra Machado Baron
Co-Orientadora: Dr^a. Patrícia Salomão Garcia
Co-Orientadora: Dr^a. Milena Martins Andrade

APUCARANA
2020



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**
Câmpus Apucarana
COLIQ – Coordenação do Curso Superior de
Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DE BIOFILMES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

por

Michael Conceição de Castro

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 11 dias do mês de Setembro do ano de 2020, às 16 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química, linha de pesquisa Química Orgânica, do Curso Superior de Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados.

Profa. Dr^a. Alessandra Machado Baron
ORIENTADORA

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe
EXAMINADOR

Prof. Dr. Rafael Block Samulewski
EXAMINADOR

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Após um longo período de curso, com aprovações e reprovações, com ódio, lágrimas e risadas, sofrimentos e amigos sinceros, são tantas pessoas e momentos que tenho a agradecer que não caberiam todos aqui neste simples texto.

Agradeço primeiramente a Deus, pois, mesmo com vontade imensa de desistir Ele sempre me deu forças e foi me empurrando do jeito que deu até chegar neste momento da minha vida.

Agradeço imensamente a minha orientadora Alessandra Machado Baron, assim como seu marido Orlando Baron. Ao final deste ciclo a senhora acabou se tornando muito mais do que uma professora e orientadora, se portando muitas vezes como mãe, me apoiando não só nas aulas ou laboratórios mas sim na vida como um todo. Muitos foram os momentos de desabafo, conversas a respeito do que realizar no laboratório e sobre o futuro incerto que em sua grande maioria acabavam virando conversas divertidas e de desabafos, sempre sai mais leve de sua sala prof, menos quando a senhora dava bronca e me cobrava algo que eu já deveria ter feito ou então fiz errado, mesmo assim, a senhora sempre com seu jeito mãezona. Não tenho como agradecer tudo o que a senhora fez por mim, a senhora tem um lugar cativo, eterno em meu coração, foi minha mãe de coração e laboratório, no momento mais difícil da minha vida a senhora me estendeu a mão me apoiou do início ao fim, sempre acreditou em mim mesmo quando nem eu mesmo acreditava mais, só tenho a agradecer por ter tido a honra de ter tido a senhora em minha vida prof, de ter sido orientado por uma pessoa tão incrivelmente incrível assim.

Agradeço imensamente a oportunidade de ter tido a honra de conhecer minha co-orientadora Patrícia Salomão Garcia, sempre animada, exigente e sempre nos incentivando a sermos melhores do que fomos ontem. Uma pessoa que viveu seus dilemas e desafios pessoais, não se deixou abalar e foi em busca do seu lugar ao sol, e hoje é essa pessoa incrível, simplesmente uma das melhores pessoas que já conheci em minha vida, por onde passa esbanja alegria e animação. Sempre animada, espontânea, divertida, justa, com seu quadro super organizado e colorido, didática impecável e jeito único de segurar o giz para escrever no quadro. A senhora tem um espaço eterno em meu coração também prof.

Acrescento também a lista de professoras que não poderiam faltar neste agradecimento, a professora Fabiana Giacomini, professora de cálculo e matérias a

fins, nunca fui muito bom nestas disciplinas mas graças ao grande empenho desta pessoa tão formidável e incrível consegui vencer mais este desafio. Uma pessoa que assim como as professoras anteriormente citadas, me apoiou muito no momento mais difícil de minha vida, sempre me ajudou, seja tirando dúvidas sobre as disciplinas, seja ajudando diretamente a resolver problemas pessoais ou mesmo com conversas longas de desabafo que sempre começavam com uma dúvida sobre algum determinado exercício e acabavam sendo sempre um alívio para mim. Como costumo sempre dizer, a senhora é um anjo disfarçado de pessoas entre nós prof, tenho e terei muito carinho pela senhora, hoje e sempre.

Professora Milena Martins Andrade por ter sido minha primeira professora de iniciação científica e ao professor Elton por ser esse exemplo de professor ao qual me espelho em um dia poder ser 20% do que o senhor é hoje, enfim, aos demais professores, como foram muitos os quais me estenderam a mão, sou grato a todos.

Aos amigos de faculdade, companheiros de horas de desespero e raiva, choro, risadas e claro muitas trapalhadas, sou grato a todos, não citarei nomes para não cometer o a injustiça de deixar de mencionar algum aqui. Porém, destaco o pessoal da turma de Processos Químicos, tenho todos em meu coração, mesmo sem saberem, realizaram um sonho meu que era um dia conhecer a hidroelétrica Itaipu e as Cataratas, além de me ajudaram a suportar os pesares do momento mais difícil que já passei sem me deixar desistir.

Aos muitos amigos que fiz no curso de Licenciatura, só tenho a agradecer todos que estiveram comigo desde o começo desta jornada. Ao meu amigo Ricardo, companheiro de laboratório, de diversas disciplinas, e muitas trapalhadas, sou imensamente grato por ter a honra e o prazer de ter um amigo como você, um cara simplesmente sem palavras. Meu amigo Guilherme Jesus, com seu estilo único, parceiro de estágio e de tantas outras presepadas, outro cara que me apoiou muito e que tenho muito orgulho de ter como amigo. Estes dois em específico, considero como se fossem meus irmãos, não de sangue mas sim da vida.

Pedro Alfredo e Dom Diego, outros irmãos de vida que a faculdade me deu, grato também por todo apoio desde o começo desta jornada, com vocês eu aprendi muito, ainda vamos vencer na vida. Jennifer Ascêncio por me fazer gostar e entender Química Orgânica, André parceiro de curso muito antes da faculdade, Thamires Pires de Oliveira, uma pessoa abençoada com o dom da empatia, assim que ficou sabendo o que se passava, não pensou duas vezes e buscou meios de me ajudar até mesmo financeiramente, nunca vou me esquecer deste ato por sua parte.

Alessandra de Paula, outra pessoa incrível, com um dom de entendimento de mundo simplesmente fantástico, minha irmão de alma. Marcos, Evandro, Guilherme(s), são inúmeras pessoas a agradecer, não dá pra citar todos, mas tenham certeza que sou e serei eternamente grato a cada um que um dia passou por meu caminho.

Agradeço meus pais, mesmo com nossas diferenças, sei que só queriam o melhor para mim baseado no que eles acreditavam ser o certo.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a minha namorada, parceira e confidente, Sirlei Marques Paschoal, ela veio quietinha como quem não quer nada e mudou meu mundo, sempre com muito amor, companheirismo, apoio, carinho e puxões de orelha quando necessário. Sem ela este momento não teria este brilho tão especial como está tendo agora.

Novamente, agradeço a Deus por ter colocado cada pessoa que colocou em meu caminho, por me fazer passar pelas situações que passei, algumas não tão boas assim, mas que ainda sim serviram de aprendizado.

RESUMO

CASTRO, Michael Conceição. **Produção de Biofilmes para Imobilização de Lipases**. 2020. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

Neste trabalho, um filme eco-amigável (amido de mandioca, álcool polivinílico e sericina AM-PVA-SS) foi sintetizado, caracterizado e aplicado como um novo suporte para a imobilização de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por adsorção. As espessuras medidas do filme estavam entre 230 e 309 μm e exibiram maior flexibilidade e maleabilidade sobre o filme sem sericina. Com base na reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), a retenção de atividade da lipase imobilizada foi de 987%. Para condições ótimas, o rendimento em oleato de etila foi de 95% para a enzima imobilizada e 21 ± 5 (24 h) $68 \pm 12\%$ (48 h) para a enzima livre. O rendimento máximo foi obtido a 49 °C, razão molar ácido oleico: etanol de 1:3, 1,25 g de lipase-filme ou 50 U e 30 h. Mesmo após 7 ciclos de uso, a lipase imobilizada apresentou redução de 52% no rendimento de éster. O filme eco-amigável é um material promissor como suporte para imobilizar lipases e aplicação em biocatálise.

Palavras-chave: Biocatálise. Lipase. Bio-suporte. Imobilização.

ABSTRACT

CASTRO, Michael Conceição. **Production of Biofilms for Immobilization of Lipases**. 2020. 41 f. Course Conclusion Paper (Degree in Chemistry), Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2020.

In this study, an eco-friendly film (cassava starch, polyvinyl alcohol and sericin blend-AM-PVA-SS) was synthesized, characterized and applied as a novel support for *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase immobilization by adsorption. Measured film thicknesses were between 230 and 309 μm and exhibited increased flexibility and malleability over film without sericin. Based on *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) hydrolysis reaction, the activity retention of immobilized lipase was 987%. For optimal conditions, the yield in ethyl oleate was 95% for immobilized enzyme and 21 ± 5 (24 h) $68 \pm 12\%$ (48 h) for free enzyme. Maximum yield was obtained at 49 °C, molar ratio oleic acid:ethanol of 1:3, 1.25 g lipase-film or 50 U and 30 h. Even after 7 cycles of use immobilized lipase showed 52% reduction in ester yield. Eco-friendly film is a promising material as support to immobilize lipases and application in biocatalysis.

Keywords: Biocatalysis. Lipase. Bio-support. Immobilization.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Trabalhos citados na literatura contendo estudos sobre suportes com sericina para imobilização de enzimas.....	21
Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 utilizado nos estudos de síntese do oleato de etila catalisada por lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.	28
Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^2 utilizado nos estudos de síntese do oleato de etila catalisada por lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.	28
Tabela 3 – Solubilidade dos filmes AM-PVA-SS e AM-PVA.....	35
Tabela 4 – Resultados dos experimentos realizados por planejamento fatorial 2^3 aplicado na síntese de oleato de etila catalisada por lipase EC-01 de <i>Botryosphaeria ribis</i> imobilizada em filme de AM-PVA-SS.	38
Tabela 5 – Coeficientes de Contraste (C_i) (pontos percentuais para a conversão do éster) calculados a partir do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 4).	38
Tabela 6 – Resultados dos experimentos realizados por planejamento fatorial 2^2 aplicado na síntese de oleato de etila catalisada por lipase EC-01 de <i>Botryosphaeria ribis</i> imobilizada em filme de AM-PVA-SS.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais reações catalisadas por lipases.	15
Figura 2 – Métodos de Imobilização enzimática.....	17
Figura 3 – Estrutura do fio do casulo do Bicho da Seda.	20
Figura 4 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila catalisada por lipase.	30
Figura 5 – Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres.....	32
Figura 6 – Espectro ATR-FTIR dos filmes AM-PVA e AM-PVA-SS.	36
Figura 7 – Cinética da síntese do oleato de etila catalisada por lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.	37
Figura 8 – Análise geométrica dos coeficientes de contraste da cinética da síntese do oleato de etila catalisada por lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.	39
Figura 9 – Reutilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em filmes de AM-PVA-SS em reações de síntese do oleato de etila. Condições: razão molar 3 de etanol (225 mmol L^{-1}), 75 mmol L^{-1} de ácido oleico, 1,25 g de enzima imobilizada, $49 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 rpm, 30 h.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Amido

AM-PVA-SS – Amido, Álcool Polivinílico e Sericina

AM-PVA – Amido, Álcool Polivinílico

Ao – Atividade observada na enzima livre ($U\ g^{-1}$ do suporte)

At – Atividade teórica da enzima imobilizada ($U\ g^{-1}$ do suporte)

At_f – Atividade total final frente ao *p*NPP

At_i – Atividade total inicial frente ao *p*NPP

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

B. mori – *Bombyx mori*

B. ribis EC-01 – *Botryosphaeria ribis* EC-01

CMC – Carboximetilcelulose

DCMC – Dialdeído carboximetilcelulose

DMU – Dimetilolureia

FB – Fibroína

FES – Fermentação Estado Sólido

FSM – Fermentação Submersa

FTIR – Infravermelho por Transformado de Fourier

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

*p*NPP – Palmitato de *p*-nitrofenila

PVA – Álcool Polivinílico

R – Retenção da atividade da enzima imobilizada ($U\ g^{-1}$ do suporte)

RM – Razão molar (ácido/álcool)

SS – Sericina

S – Solubilidade

U – Unidades totais de enzima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 LIPASES	15
3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	16
3.2.1 Métodos Químicos	17
3.2.1.1 <i>Ligação Covalente</i>	17
3.2.1.2 <i>Ligação Covalente Cruzada</i>	18
3.2.2 Métodos Físicos	18
3.2.2.1 <i>Aprisionamento/Encapsulamento</i>	18
3.2.2.2 <i>Adsorção Física/Iônica</i>	19
3.3 SERICINA.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO E PRODUÇÃO DE LIPASE	23
4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME COM SERICINA.....	23
4.2.1 Extração e liofilização da sericina	23
4.2.2 Produção do filme	24
4.2.3 Caracterização dos filmes	24
4.2.3.1 <i>Espessura</i>	24
4.2.3.2 <i>Solubilidade</i>	25
4.2.3.3 <i>Propriedades mecânicas</i>	25
4.2.3.4 <i>FTIR</i>	26
4.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	26
4.4 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	26
4.4.1 Otimização da síntese do oleato de etila	27
4.4.2 Reutilização da lipase imobilizada na síntese do oleato de etila	29
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
4.6.1 Hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP).....	30
4.6.2 Dosagem da atividade do sobrenadante antes e após a imobilização	31
4.6.3 Método de Lowry-Tinsley	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 CARATERIZAÇÃO DO FILME.....	34
5.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE	36
5.3 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	37
5.4 Estudo Comparativo da Síntese do Oleato de Etila Utilizando a Enzima Livre e a enzima imobilizada	41
5.5 REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA	42
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos, a busca por processos e reações químicas cada vez mais eficientes, que demandem menores custos, que não sejam ou gerem resíduos nocivos à natureza, que gerem produtos mais estáveis, e que sejam economicamente viáveis, tornou-se cada vez mais evidente. Por isso, a biotecnologia, uma das áreas responsáveis por estudar e buscar maneiras de como tornar realidade as necessidades acima citadas, permanece sendo alvo de estudos e constante evolução ao longo dos anos (ARROYO, 1998).

Neste contexto, as enzimas são amplamente usadas em vários processos industriais e têm vantagens econômicas e ambientais consideráveis em relação aos métodos convencionais. Tendo um mercado em expansão, é previsto que a aplicação de enzimas atinja, mundialmente, US\$ 17,50 bilhões até 2024 (PELLIS *et al.*, 2018).

Muitos dos processos industriais existentes podem ser catalisados por enzimas, uma vez que permite trabalhar com condições de temperatura, pH e pressão mais brandas quando comparadas com catalisadores químicos convencionais. Outra vantagem é a seletividade da enzima pelo substrato e a não produção de co-produtos indesejados, além do fato de enzimas apresentarem um poder catalítico melhor que os catalisadores convencionais (ARROYO, 1998).

Entretanto, mesmo com as vantagens citadas, a aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais ainda é limitado por alguns fatores como: solubilidade em água, estabilidade frente ao meio reacional e recuperação do catalisador. A aplicação de enzimas imobilizadas pode ser um caminho viável para solucionar estes problemas, permitindo em muitos casos a reutilização do catalisador, possibilitando a redução no custo de produção (ARROYO, 1998; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Em se tratando de imobilização enzimática, suportes como polímeros eco-amigáveis, 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. Polímeros biodegradáveis como celulose, PVA (álcool polivinílico), amido, gelatina, carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram usadas para a imobilização de enzimas em

forma de película, membrana ou grânulos sendo esses polímeros facilmente recuperados e reutilizados (BATISTA *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2011).

Considerando os materiais eco-amigáveis, a sericina (proteína que envolve os fios de fibroína, presente do casulo do bicho da seda) tem uma posição de destaque, por ser classificada como biodegradável e biocompatível. Entretanto, poucos trabalhos relatam a utilização desta proteína na composição de suportes para imobilização enzimática (OH *et al.*, 2007; PADAMWAR; PAWAR, 2004; SANTANA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2004).

Como filmes produzidos unicamente de sericina são frágeis e quebradiços, a adição de plastificantes (como o glicerol) e outros polímeros biodegradáveis como o amido e o álcool polivinílico, podem minimizar estes inconvenientes (ARAMWIT; SIRITIENTONG; SRICHANA, 2010; KUNDU; KUNDU, 2012; OH *et al.*, 2007; YUN *et al.*, 2016).

Tendo em vista a preocupação com a utilização de suportes eco-amigáveis e de baixo custo, filmes contendo amido, álcool polivinílico e sericina, (AM-PVA-SS) foram produzidos para imobilizar lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01, através do método de adsorção denominado sanduíche e aplicados como catalisadores em reações de hidrólise e síntese de éster (oleato de etila) (SANTANA *et al.*, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir biofilmes contendo amido de mandioca, álcool polivinílico e sericina (AM-PVA-SS) para imobilização de lipase de *B. ribis* EC-01 e aplicação em biocatálise (hidrólise e síntese de éster).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

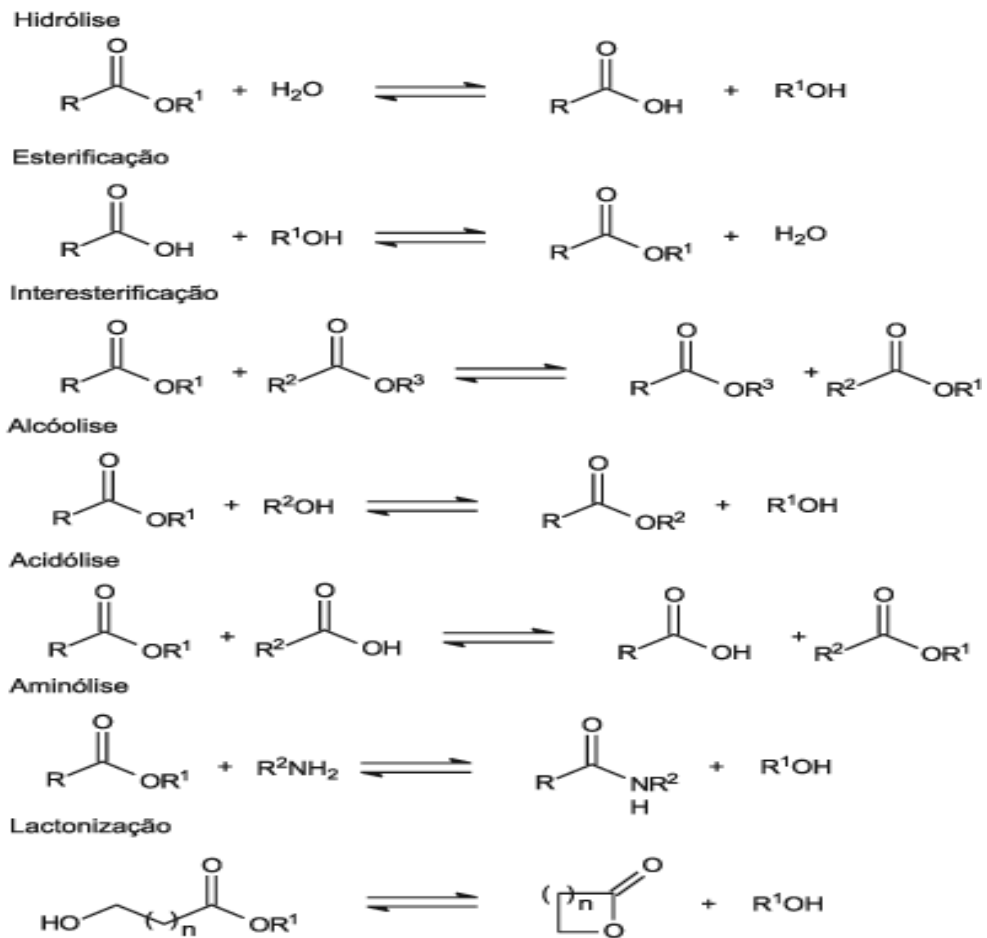
- Produzir a enzima por fermentação submersa e concentrá-la por precipitação com sulfato de amônio;
- Extrair e liofilizar a sericina;
- Confeccionar filmes contendo amido e álcool polivinílico (AM-PVA) (controle) e filmes contendo amido, álcool polivinílico e sericina (AM-PVA-SS);
- Caracterizar os filmes quanto à espessura, propriedades mecânicas, solubilidade em água, etanol e *n*-hexano e por FTIR (Infravermelho por transformado de Fourier);
- Imobilizar lipase de *B. ribis* por adsorção: enzima-filme-enzima;
- Utilizar os filmes (AM-PVA-SS) contendo a enzima imobilizada em reações de hidrólise (método de pNPP) e síntese de ésteres (reação de esterificação: síntese do oleato de etila).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LIPASES

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, transesterificação, interesterificação e aminólise, constituindo uma classe especial de esterases (Figura 2). Podem apresentar ainda, especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade quanto ao substrato (BORELLI; TRONO, 2015; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Figura 1 – Principais reações catalisadas por lipases.



Fonte: Paques e Macedo (2006).

De maneira geral, lipases apresentam peso molecular que pode variar entre 40 a 62 kDa, além de contar com uma cadeia de aproximadamente 300 aminoácidos residuais, semelhante a várias outras enzimas. Outro fato interessante sobre as lipases se dá devido ao fato de poderem ser encontradas tanto em animais, vegetais e micro-organismos (fungos e bactérias). Lipases oriundas de micro-organismos são as mais utilizadas em processos industriais, pois possuem procedimentos de isolamento mais simples, podendo ser produzidas por fermentação submersa (FSM), processo no qual é necessário um meio líquido para que o micro-organismo se desenvolva, se alimente e produza a enzima, ou fermentação em estado sólido (FES) no qual o micro-organismo é introduzido a um meio produzido a base de sementes e outros resíduos sólidos que servem como fonte de nutrientes para o micro-organismo se alimentar, se desenvolver e produzir a enzima.

Além disso, lipases de origem bacteriana ou fúngica, comumente são mais estáveis e apresentam propriedades diferentes de lipases oriundas de outras fontes. Essas diferenças de propriedades e características se deve ao tipo do micro-organismo, sua família, classe, espécie, cepa, condições de crescimento, dentre outros fatores (MESSIAS *et al.*, 2011).

Lipases são amplamente utilizadas em processos de síntese orgânica, devido ao fato de não requererem cofatores e atuarem em ampla faixa de pH dependendo das condições reacionais (PASTORE; DA COSTA; KOBLITZ, 2003).

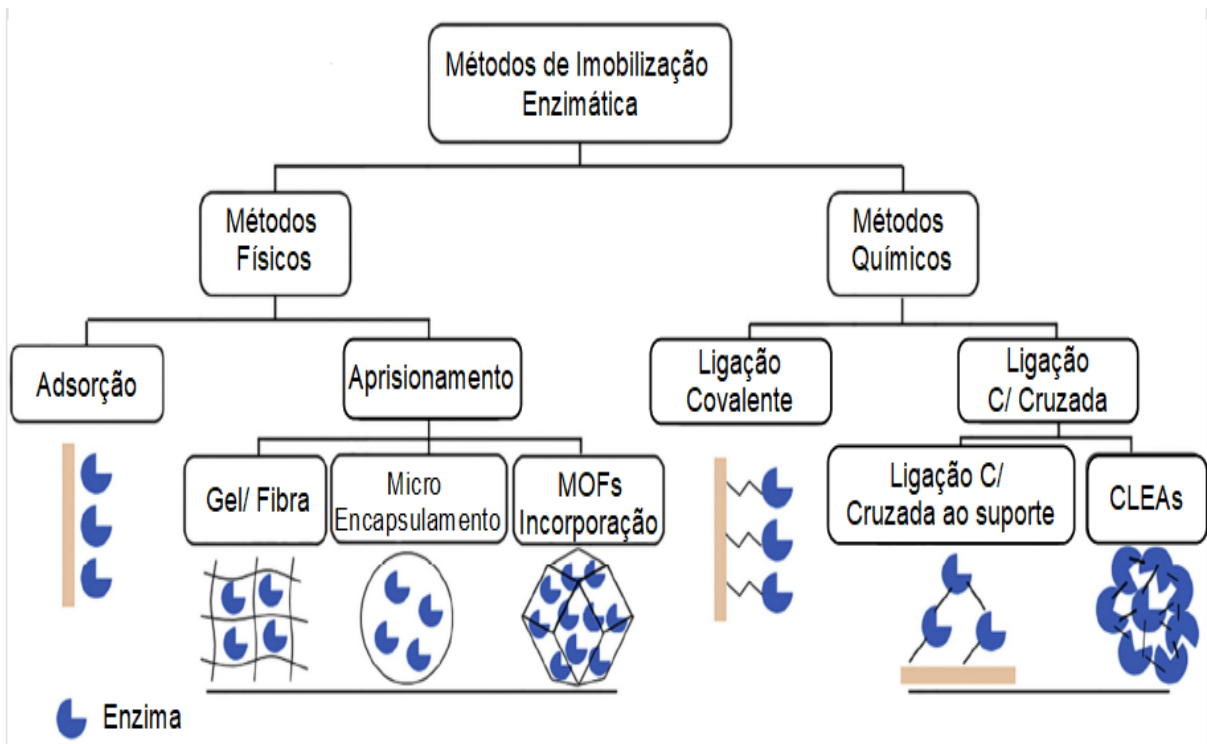
Em relação ao setor industrial, as lipases podem ser aplicadas na indústria de detergente, na área de alimentos como sintetizadoras de ésteres que podem ser utilizados como flavorizantes dos alimentos que consumimos, no setor têxtil para tratamento de couro hidrolisando a gordura (lipídios) presente no material, na indústria de óleo e gordura, na indústria de cosméticos, na fabricação de papel, na área farmacêutica, no setor energético auxiliando na síntese de biodiesel, no setor ambiental auxiliando em tratamento de efluentes (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O processo de imobilização enzimática consiste no aprisionamento físico ou químico de uma enzima em um material (suporte). Este processo limita a movimentação da enzima, fazendo com que ela não fique dispersa no meio reacional. Suportes que sejam compatíveis com a enzima, que mantenham a capacidade catalítica, que sejam capazes de aumentar sua estabilidade, permitam sua recuperação e posterior reutilização e que sejam biodegradáveis, estão sendo cada vez mais estudados (BATISTA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Com base na figura 1 apresentada abaixo, podemos observar os principais métodos de imobilização, sendo eles: adsorção (física, iônica), encapsulação (aprisionamento), ligação covalente e ligação covalente cruzada (Figura 1).

Figura 2 – Métodos de Imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de Liu, Chen e Shi (2018).

3.2.1 Métodos Químicos

3.2.1.1 *Ligação Covalente*

A imobilização por ligação covalente consiste em efetuar uma ligação covalente entre os grupamentos laterais da enzima com os grupamentos presentes na superfície do suporte. Este método é eficaz, pois não permite posterior dessorção da enzima, além de prolongar o tempo de vida útil do material. Entretanto, como a enzima está ligada ao suporte por uma ligação covalente, pode haver a distorção de sua estrutura terciária provocando desnaturação e perda na sua capacidade catalítica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; LIU; CHEN; SHI, 2018).

3.2.1.2 *Ligação Covalente Cruzada*

A ligação covalente cruzada se dá por meio de ligações covalentes entre a própria enzima. Este método é livre de um suporte, entretanto pelo fato da enzima não estar em sua forma livre pode acabar limitada quanto a sua movimentação dentro do meio reacional. Como desvantagens, o método pode apresentar uma baixa retenção da atividade, além de baixa estabilidade mecânica, portanto esse método acaba não sendo muito aplicado (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; LIU; CHEN; SHI, 2018).

3.2.2 Métodos Físicos

3.2.2.1 *Aprisionamento/Encapsulamento*

O método de imobilização por encapsulamento (aprisionamento) é caracterizado quando a enzima é envolvida por membranas semipermeáveis ou micelas. Este meio de imobilização é muito empregado quando se busca evitar a aglomeração da enzima evitando o desperdício do catalisador. Outra vantagem é a manutenção da atividade catalítica da enzima, o substrato deve permear pelo suporte, evitando o contato direto da enzima com o meio reacional. Entretanto, dependendo das propriedades físico-químicas do suporte, a enzima pode não alcançar o substrato, interferindo diretamente no rendimento de reação (CARDOSO; CASS; MORAES, 2009; LIU; CHEN; SHI, 2018).

3.2.2.2 *Adsorção Física/Iônica*

No método de imobilização por adsorção física, a enzima fica aderida na superfície de um suporte sólido por meio de interações de baixa energia, tais como, Van der Waals, interações hidrofóbicas, interação de hidrogênio, dentre outras. Este método se destaca ainda por ser fácil de empregar e ter um baixo custo. Entretanto, a maior desvantagem é a posterior dessorção (desprendimento) da enzima imobilizada conforme este material é reutilizado (LIU; CHEN; SHI, 2018).

No método de adsorção iônica, o suporte deve ter grupamentos com cargas positivas ou negativas em sua superfície, para que interajam com os grupamentos das cadeias laterais da enzima com cargas positivas ou negativas. Em questão de força de aderência da enzima imobilizada ao suporte, este método é mais eficaz que a adsorção física. Porém, por ser mais forte a interação, pode acabar por dificultar a dessorção das enzimas inativas do material (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

O suporte empregado neste trabalho foi um filme biodegradável composto por amido (AM), álcool polivinílico (PVA) e sericina (SS) oriundo de casulos do bicho da seda de segunda classe. O método de imobilização foi o de adsorção física no qual a enzima ficou adsorvida em ambos os lados do filme confeccionado (SANTANA *et al.*, 2019).

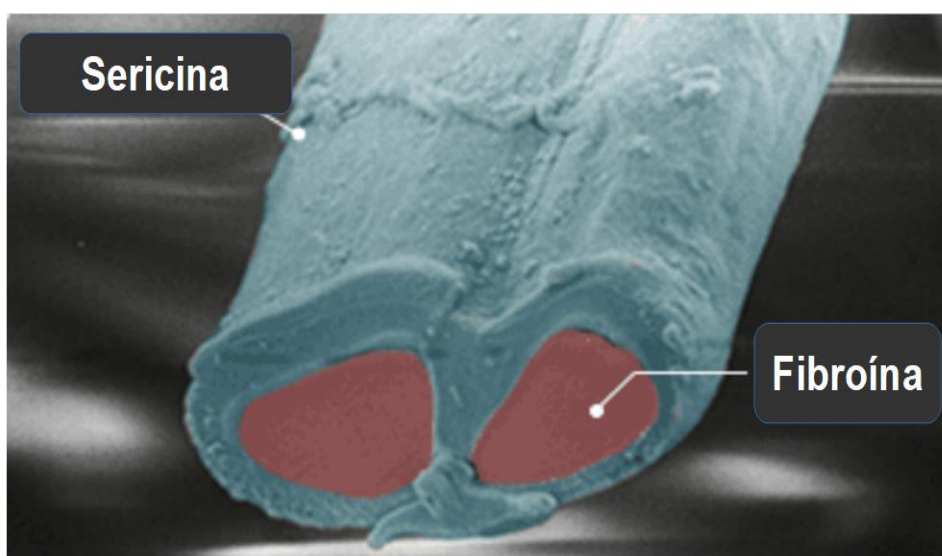
Em se tratando de filmes biodegradáveis, PVA (álcool polivinílico) e amido (mandioca) são comumente empregados para produção de filmes independente da aplicação. Já a adição de sericina, tanto na composição de filmes, como em materiais usados como suportes para imobilização, é pouco relatado na literatura.

3.3 SERICINA

Ao longo de sua vida, o bicho da seda (*Bombyx mori*) passa por algumas etapas de desenvolvimento, saindo de seu estado de larva até chegar em seu estágio final de mariposa. Diante de seus processos evolutivos, para que saia da fase de larva e torne-se uma mariposa, o bicho da seda envolver-se em um casulo para que passe por seus processos metamórficos. Este casulo é constituído por fibroína (FB) (70%-75%), uma proteína filamentosa e a sericina (SS) (25%-30%), uma proteína que tem a função de deixar os filamentos de fibroína unidos (Figura 3) (ARAMWIT, SIRITIENTONG, SRICHANA, 2007).

Sendo resíduos têxteis gerado no processo de produção da seda, tanto fibroína quanto sericina são materiais com uma vasta aplicação em diversas áreas industriais. O peso molecular da sericina varia de 24 a 400 kDa sendo em sua maioria, serina (32,%), ácido aspártico (16,8%) e glicina (8,8%) e treonina (8,75%) suas principais proteínas constituintes (SANTANA *et al.*, 2019; CAO, ZHANG, 2016).

Figura 3 – Estrutura do fio do casulo do Bicho da Seda.



Fonte: Adaptado: <https://www.puresericin.com/en/pure-sericin>.

A sericina pode ser extraída do casulo do *B. mori* por meio do processo de degomagem, uma vez que a sua cadeia de aminoácidos permite que a sericina seja solúvel em água. Dependendo do tamanho da cadeia aminoácidos da sericina extraída, pode ser utilizada em vários processos e áreas, desde medicina até cosméticos (BARAJAS-GAMBOA *et al.*, 2016).

Em relação à aplicação de sericina como suporte para imobilização de enzimas, poucos trabalhos são relatados na literatura (Quadro 1), porém, mesmo com poucos trabalhos realizados com o intuito de se utilizar sericina como constituinte e/ou material suporte para imobilização enzimática, os poucos trabalhos relatados apresentam resultados satisfatórios. Devido aos resultados relatados nos trabalhos (Quadro 1), optou-se por trabalhar com sericina como um dos constituintes do material suporte utilizado neste trabalho justamente pela sericina se mostrar um material promissor capaz de gerar grandes resultados no campo de imobilização enzimática.

Destaca-se Santana *et al.* (2018) e (2013) que relataram o uso de filmes contendo sericina e Dimetilolureia (DMU), utilizados para imobilização de lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 através do método de adsorção e encapsulamento, respectivamente. O rendimento máximo de conversão do oleato de etila foi 96% e 23% em 24 h para os métodos já mencionados.

A α -Quimotripsina foi imobilizada em Fibra de seda contendo sericina ativada com glutaraldeído. Embora a retenção da atividade tenha sido baixa (15%), a enzima imobilizada foi mais estável (78% da atividade inicial) que a enzima livre (próximo a 5% da atividade inicial) quando incubada em etanol por 1 h (25 °C). A termoestabilidade também aumentou após a imobilização. A enzima imobilizada apresentou 50% da atividade inicial após 6 h de incubação a 50 °C enquanto a enzima livre não apresentou atividade para as mesmas condições (LEE *et al.*, 2005).

Quadro 1 – Trabalhos citados na literatura contendo estudos sobre suportes com sericina para imobilização de enzimas.

Enzima	Suporte/Imobilização	Condições das reações	Principais Resultados	Ref
Lípase	Filme de SS-DMU/ Adsorção	50 mmol L ⁻¹ ácido oleico; 150 mmol L ⁻¹ etanol; 10 U; 37 °C	96% de rendimento em 24 h; 7 reutilizações	Santana <i>et al.</i> (2019)
Lípase	Filmes de SS-DMU/ Encapsulação	50 mmol L ⁻¹ ácido oleico; 150 mmol L ⁻¹ etanol; 10 U; 37 °C	23% de rendimento em 25 h	Santana <i>et al.</i> (2013)
α -Quimotripsina	Esferas de SS-M e SS-E ativadas em GA/ covalente	5 mmol L ⁻¹ HBTPNA 25 °C, 30 min	Retenção da atividade 89% (SS-M) 87% (SS-E)	Oh; Lee. (2013)
Tripsina		10 mmol L ⁻¹ de HBAPN	86% (SS-M)	
Lípase		10 mmol L ⁻¹ de pNPC	72% (SS-M)	
α -Quimotripsina	Fibra de seda com SS ativada com GA/ Ligação covalente	10 mmol L ⁻¹ HBTPNA 25 °C, 30 min; Estabilidade em etanol 25 °C, 1 h	Retenção da atividade de 15% 78% em relação a atividade inicial em presença de etanol	Lee <i>et al.</i> (2005)

L-asparaginase	Micropartículas de SS/ covalente	10-20 mg de enzima; 1,7 ml de asparagina (0,05 mol L ⁻¹), 10 min, 37 °C	65,2% de retenção da atividade	Zhang <i>et al.</i> (2004)
----------------	-------------------------------------	---	--------------------------------------	----------------------------

SS: sericina; DMU: dimetilolureia; GA: glutaraldeído; M: metanol; E: etanol; HBTPN: Hipoclorito de N-benzoil-DL-tirosina-*p*-nitroanilida; HBAPN: Hipoclorito de N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida; *p*NPC: caproato de *p*-nitrofenila.

Fonte: Autoria Própria.

Zhang *et al.* (2004) imobilizaram a L-asparaginase em micropartículas de sericina sendo a retenção da atividade de 62,5%. Em relação aos estudos de termoestabilidade, a enzima imobilizada foi mais estável, pois apresentou 90% da atividade inicial e a enzima livre 75% quando incubadas a 50 °C por 30 min.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO E PRODUÇÃO DE LIPASE

A enzima utilizada neste trabalho é oriunda do fungo *B. ribis* EC-01. Para obtenção da lipase foram executados processos de produção, extração e concentração da enzima produzida conforme Andrade (2013).

O micro-organismo foi repicado em placa de Petri (9 cm de diâmetro) e em tubos inclinados contendo BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após 5 dias, à 28 °C, 4 esferas de BDA contendo o micro-organismo (0,7 cm de diâmetro) foram cortadas e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido. O meio líquido é composto por 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5% (v/v) de glicerol P.A dissolvidos em água destilada respeitando o volume final de 25 mL. O cultivo foi agitado em shaker (180 rpm, 28 °C) e interrompido após 5 dias (Andrade *et al.*, 2013).

O sobrenadante foi separado da biomassa por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e precipitado com sulfato de amônio 20% (m/v). Após nova centrifugação a 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dialisado em água destilada por 48 h com troca da água em 24 h. O extrato resultante (extrato contendo a lipase concentrada) foi utilizado para as demais etapas do trabalho. A dosagem de atividade foi realizada através do método da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP, item 4.6.1) e as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976).

4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME COM SERICINA

4.2.1 Extração e liofilização da sericina

A extração da sericina contida nos casulos do bicho da seda foi realizada pelo método de degomagem. Os casulos foram cortados (100 g) e imersos em 700 mL de água destilada em Erlenmeyer de 1 L. A extração ocorreu a pressão de 1

kgf/cm² por 60 minutos a 120 °C em autoclave. Após, a solução foi separada dos casulos por filtração e resfriada a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi armazenada em garrafa PET e congelada a -20 °C por 24 h para precipitação da sericina. A solução contendo sericina foi descongelada a temperatura ambiente, e filtrada a vácuo. A sericina precipitada foi congelada a -18 °C e liofilizada durante aproximadamente 48 h, a -46 °C e sob vácuo de 0,1 mBar (TURBIANI *et al.*, 2011).

4.2.2 Produção do filme

Para a confecção dos filmes utilizou-se a proporção de 1,8 g de sericina (SS) liofilizada, 8,1 g de amido de mandioca (AM), 3,9 g de álcool polivílico (PVA), 2,52 g de glicerina em 400 mL de água destilada a temperatura ambiente. A solução foi preparada dissolvendo-se o glicerol em água e adicionando os demais reagentes em seguida. Após 2 h a 95 °C, alíquotas de 130 mL da solução filmogênica foram transferidas para placas de polipropileno (diâmetro 15 cm) e levadas a uma estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 h, para geleificação e formação do filme por evaporação. Também foram produzidos filmes controle (sem sericina) a fim de comparação com os filmes contendo sericina.

4.2.3 Caracterização dos filmes

Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, solubilidade, espectroscopia na região do infravermelho por FTIR e propriedades mecânicas.

4.2.3.1 Espessura

Para realizar os testes de espessura, utilizou-se um micrômetro digital Starret®– 3206 (resolução de $\pm 0.001\text{mm}$). A espessura final foi calculada pela média aritmética de cinco medidas aleatórias sobre uma área de 5 cm de diâmetro.

4.2.3.2 Solubilidade

A solubilidade dos filmes (controle e com SS) estudada nos solventes, água, *n*-heptano e etanol. Os filmes produzidos foram recortados (2 x 2 cm), pesados antes e após secagem em estufa com circulação de ar a 70 °C por 24 h. Em seguida, foram imersos em 20 mL dos solventes (24 h 150 rpm) com controle de temperatura a 25 °C. Após, as amostras foram separadas dos solventes, levadas novamente a estufa a 70 °C por 24 h. A solubilidade foi calculada seguindo a Equação 1:

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

onde: m_i : massa inicial (antes da umidade); ω : massa referente à umidade; m_f : massa final (após contato com solvente).

4.2.3.3 Propriedades mecânicas

Os estudos quanto às propriedades mecânicas dos filmes confeccionados foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Alimentos no Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela professora co-orientadora Patrícia Salomão Garcia. Com auxílio de um texturômetro, as análises realizadas buscaram mensurar a resistência e a elasticidade do biofilme controle e com sericina, a fim de saber quais foram as alterações causadas no material devido a adição da proteína.

4.2.3.4 FTIR

Os espectros de FTIR foram obtidos por meio de espectrofotômetro FT-IR (Varian, modelo 640-IR, São Paulo, Brasil) provido de um módulo para leitura de Refletância Total Atenuada Universal (UATR) Pike Miracle HATR com base de cristal diamante/ZnSe e tripla reflexão. As análises se deram na região do infravermelho médio com Transformada de Fourier, abrangendo número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a etapa de imobilização enzimática, preparou-se 10 mL de solução enzimática em tampão fosfato pH 8,0; 0,05 mol L^{-1} , contendo 30% de isopropanol totalizando 100 U, (método do pNPP) e $2,06 \pm 0,06$ mg de proteína (método de Bradford). Os filmes produzidos foram recortados sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Sobre os filmes recortados, 5 mL da solução enzimática (50 U) foram depositadas em um dos lados do filme. Após secagem da solução em estufa com circulação a 28 °C (2 h), inverteu-se o filme sendo depositada o restante da solução enzimática (5 mL, 50 U) e novamente levados a estufa para secagem. Após, os filmes contendo a enzima imobilizada foram recortados (4 x 4 mm) e armazenados em refrigerador (4 °C) para posteriormente utilização nas reações de hidrólise do pNPP e esterificação do oleato de etila. Para verificar a eficácia do processo de imobilização, a retenção da atividade foi determinada com base na Equação 2.

$$R = \frac{A_o}{A_T} 100 \quad (2)$$

Sendo: A_o : atividade observada (real) da enzima imobilizada (U g^{-1} do suporte);

A_T : atividade teórica da enzima imobilizada (U g^{-1} do suporte); U: unidades totais de atividade ($\mu\text{mols do produto min}^{-1}$).

4.4 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A fim de verificar a capacidade catalítica da enzima imobilizada no filme em reação não-aquosas, reações de síntese do oleato de etila foram estudadas.

Inicialmente estudou-se a síntese do oleato de etila nas seguintes condições: 473 μL de ácido oleico (1,5 mmol), 175 μL de etanol (3 mmol) ou seja razão molar (RM) 1:2, 75 U de enzima, 10 mL de *n*-heptano, 37 °C, 150 rpm e a cinética foi acompanhada nos intervalos de 0, 1, 3, 6 e 24 h. Após, dois planejamentos fatoriais (Tabelas 1 e 2) foram realizados. As reações foram preparadas em Erlenmeyers de 25 mL contendo 10 mL de *n*-heptano, sob agitação a 150 rpm e 24 h. Alíquotas de 100 μL foram retiradas nos intervalos de 0 e 24 h.

Para comparar a catálise usando a enzima imobilizada, foram realizadas reações com a enzima livre (liofilizada, 50 U). Para tal, foram utilizadas as condições otimizadas no planejamento fatorial (com enzima imobilizada): 10 mL de *n*-heptano, 75 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 225 mmol L⁻¹ de etanol (RM 1:3), 150 rpm, 49 °C e 24 e 48 h. Essas reações foram realizadas em triplicata.

As alíquotas retiradas foram armazenadas em eppendorfs de 2 mL para posterior dosagem do ácido oléico residual e quantificação do éster através do método de Lowry-Tinsley (1976) (item 4.6.3). Uma curva padrão foi construída usando ácido oleico sob as mesmas condições. O rendimento em éster foi calculado a partir do consumo de ácidos graxos livres.

4.4.1 Otimização da síntese do oleato de etila

No primeiro planejamento fatorial, foram testados os efeitos dos parâmetros experimentais temperatura (X_1), razão molar ácido/álcool (X_2) e unidades totais de enzima adicionadas ao meio (X_3). As variáveis foram estudadas em 2 níveis (+1, nível superior; -1, nível inferior) por um delineamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central (0, nível médio), tendo como resposta o rendimento em éster (oleato de etila, 24 h) (Tabela 1). A reação foi iniciada pela adição de ácido oleico (75 mmol L⁻¹) ao meio reacional contendo álcool etílico, *n*-heptano e enzima. A concentração do álcool foi de 75, 150 e 225 mmol L⁻¹, para os ensaios com razão molar

ácido:álcool de 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente e quantidade suficiente de enzima imobilizada para fornecer a concentração de enzima requerida pelo planejamento, em unidades de atividade enzimática de hidrólise do pNPP (50 U; 75 U e 100 U ou 1,25 g, 1,875 g, 2,50 g de filme).

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 utilizado nos estudos de síntese do oleato de etila catalisada por lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	37	44
Unidades Totais de Enzimas (U)	50	75	100
Razão Molar (ácido: álcool) (RM)	1:1	1:2	1:3

Fonte: Autorial Própria.

Para o segundo planejamento fatorial, foram testados os efeitos dos parâmetros experimentais temperatura (X_1) e razão molar ácido/álcool (X_2). As variáveis foram estudadas em 2 níveis (+1, nível superior; -1, nível inferior) por um delineamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central (0, nível médio), tendo como resposta o rendimento em éster (oleato de etila, 24 h) (Tabela 2). A reação foi iniciada pela adição de ácido oleico (75 mmol L^{-1}) ao meio reacional contendo álcool etílico, *n*-heptano e enzima. A concentração do álcool foi de 225, 300 ou 375 mmol L^{-1} , para os ensaios com razão molar ácido:álcool de 1:3, 1:4 e 1:5, respectivamente e quantidade de enzima imobilizada foi fixada em 50 unidades de atividade enzimática de hidrólise do pNPP (1,25 g de filme).

Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^2 utilizado nos estudos de síntese do oleato de etila catalisada por lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (T °C)	44	49	54
Razão Molar (ácido: álcool) (RM)	1:3	1:4	1:5

Fonte: Autorial Própria.

A influência de cada variável e os possíveis efeitos sinérgicos na reação foram calculados a partir dos coeficientes de contraste (denominados efeitos principais e secundários) (Equação 3).

$$C_i = \frac{2(\sum y_i^+ - \sum y_i^-)}{n} \quad (3)$$

Sendo: C_i o coeficiente de contraste da variável independente i , os valores de y_i^+ são os valores obtidos para a variável de resposta (% em éster) quando a variável independente i está em seu nível máximo, os valores de y_i^- são os valores obtidos para essa variável de resposta quando a variável independente i está em seu nível mínimo e n é o número de experimentos.

4.4.2 Reutilização da lipase imobilizada na síntese do oleato de etila

Após análises dos resultados das reações previstas pelos planejamentos fatoriais, encontrou-se as condições otimizadas para se obter o maior rendimento em éster. Tais condições foram aplicadas em uma nova reação de esterificação reutilizando a enzima imobilizada. A perda de massa do filme contendo a enzima também foi analisada. Para os estudos de reutilização, as reações de esterificação foram realizadas nas seguintes condições: 1,25 g de enzima imobilizada (50 U), 10 mL de *n*-heptano, 75 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 225 mmol L⁻¹ de etanol (RM 1:3), 150 rpm, 49 °C, por 30 h. Após cada uso, o biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração, lavado com *n*-hexano e seco em um dessecador a vácuo por 16 h (temperatura ambiente). As quantidades dos reagentes foram recalculadas de acordo com a perda de massa da enzima imobilizada. Este procedimento foi repetido até perda de 50% da eficiência catalítica. As conversões, após cada reação, foram comparadas com a conversão obtida no primeiro ciclo.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP)

Este método espectrofotométrico foi utilizado no trabalho para determinar a atividade lipolítica do extrato bruto concentrado e da enzima imobilizada. Foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactante o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm sendo a atividade lipolítica calculada em unidades por mL ($U\ mL^{-1}$) ou por mg (para a enzima imobilizada) (Figura 4) seguindo a equação 4.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\varepsilon \cdot X_{enz}} \quad (4)$$

Sendo: C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos);

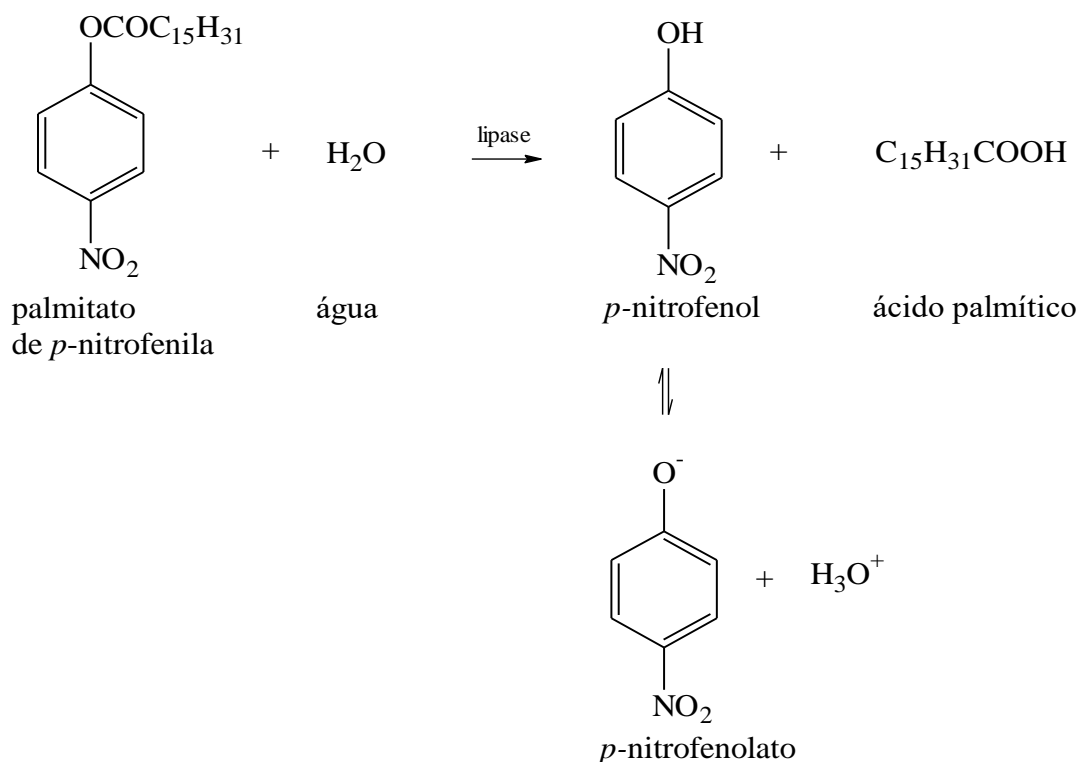
60: transformação de segundos para minuto;

ND: fator de diluições;

ε : coeficiente de extinção molar do *p*NPP a pH 7,0;

X_{enz} : volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (em mg).

Figura 4 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipase.



Fonte: Baron (2008).

4.6.2 Dosagem da atividade do sobrenadante antes e após a imobilização

Antes da imobilização, 300 μL de solução A (3 mg mL^{-1} palmitato de *p*-nitrofenila dissolvidos em 10 mL de isopropanol) foram misturados com 2,7 mL de solução B (2 g de Triton X-100, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} pH 8,0), lentamente e sob contínua agitação. Desta solução, 0,9 mL foram colocados em cubeta, estabilizada a temperatura de 55 °C sendo adicionada 0,1 mL da solução de extrato bruto concentrado (enzima) ou de tampão (branco). A reação foi realizada em cubeta de 1,0 mL sendo a leitura feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 55 °C e pH 8,0. A cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorbâncias a cada 20 s durante 2 min em 410 nm.

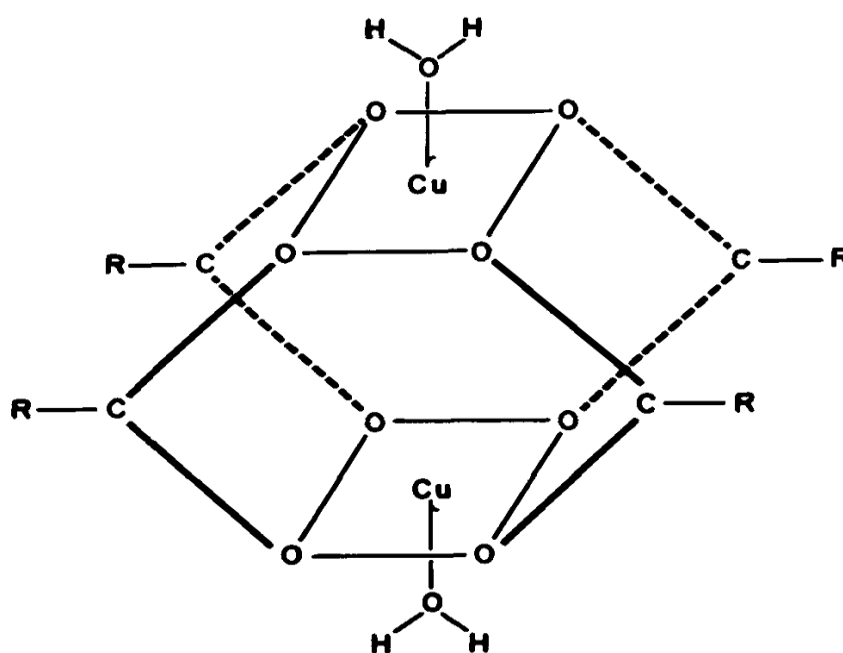
Para dosagem da atividade da enzima imobilizada, a reação ocorreu com controle de temperatura (55 °C), sob agitação manual em erlenmeyers de 25 mL contendo 10 mL de meio reacional (1 mL da solução A com 9 mL da solução B) e iniciada com a adição de 1 mg de enzima imobilizada. A cinética das reações foi seguida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min), transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 410 nm. As dosagens foram feitas em triplicata.

4.6.3 Método de Lowry-Tinsley

Este método (LOWRY; TINSLEY, 1976) foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ésteres formados a partir do teor residual de ácido oleico, produzido durante a síntese de ésteres catalisada pelas lipases de *B. ribis* EC-01. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado, formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica, em comprimento de onda de 715 nm (Figura 5). Uma unidade de atividade enzimática (U) é correspondente à quantidade de enzima que promove o consumo de $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido graxo, nas condições do ensaio.

Às alíquotas de 100 μL , retiradas durante as reações de esterificação armazenadas em eppendorfs de 2 mL, adiciona-se 1,15 mL de Tolueno e 250 μL de solução de Lowry-Tinsley (Acetato de Cu^{2+} 5%, com pH 6,0-6,2 corrigido com piridina). A mistura foi agitada em vórtex (agitador de tubos) durante 1 min e centrifugada por 10 min, 3000 rpm. A absorbância da fase orgânica é lida a 715 nm.

Figura 5 – Complexo formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres.



Fonte: Lowry;Tinsley (1976).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARATERIZAÇÃO DO FILME

A adição de sericina (SS) ao filme de amido (AM) e álcool polivinílico (PVA), não trouxe alterações na capacidade de manuseio nem de processamento do filme em relação ao filme sem sericina. A espessura do filme confeccionado variou dentro a faixa de 230 a 309 μm .

Por outro lado, a adição de SS mostrou-se ser capaz de alterar a resistência à tração e alongamento na ruptura, dos filmes confeccionados. A resistência à tração dos filmes AM-PVA-SS mostrou-se inferior ($6,73 \pm 1,08$ MPa) se comparada ao filme AM-PVA ($12,31 \pm 2,38$ MPa). Em contra partida, a adição de SS aumentou o alongamento na ruptura do filme AM-PVA-SS ($94,02 \pm 18,90\%$) em relação ao filme sem SS ($11,39 \pm 2,40\%$). Os resultados de resistência a tração obtidos já eram esperados, uma vez que quanto mais resistente menor será a flexibilidade do material e vice-versa.

Joshi, Gulrajani e Bar (2015) avaliaram a conversão da SS em forma de filme tornando-a insolúvel através da formação de complexo de metal sericina-alumínio usando sal de alume, o que pode levar a uma extensão de reticulação, o que aumentaria a resistência do filme com uma conseqüente redução na flexibilidade. Os autores observaram que os filmes de SS pura apresentaram maior alongamento no intervalo do que os filmes de SS modificada.

Wang *et al.* (2019) desenvolveram uma nova estratégia de reticulação de SS com Dialdeído carboximetilcelulose (DCMC) por meio da reação de base de Schiff. Os autores observaram que com o aumento do conteúdo de DCMC, o alongamento na ruptura dos filmes diminuiu. Misturas de SS com outros polímeros foram produzidas para melhorar as propriedades mecânicas, sugerindo que o material possa atuar como suporte para imobilização enzimática.

He *et al.* (2017) desenvolveram filme de mistura de SS-PVA. Segundo os autores, o álcool PVA foi misturado com SS para melhorar o desempenho mecânico. As curvas tensão-deformação das misturas de SS-PVA mostraram que, à medida que a concentração de PVA aumenta, a resistência dos filmes com SS diminui à medida que se tornam mais flexíveis.

De acordo com resultados obtidos por Garcia *et al.* (2018), meio a uma mistura de polímeros, a presença de SS em pequena quantidade, fez com que a proteína se comportasse de maneira semelhantemente a um agente surfactante, fazendo com que aminoácidos de caráter hidrofóbicos e hidrofílicos presentes em suas cadeias laterais interajam com os polímeros presentes no meio (AM; PVA) dando origem a um material mais resistente e pouco flexível.

O resultado obtido neste trabalho é diferente dos relatados anteriormente. É possível que o impedimento estérico causado pela presença de proteínas diminua a interação intermolecular entre polímeros, produzindo filmes com maior maleabilidade e flexibilidade (maior alongamento na ruptura).

Em relação à solubilidade, os filmes foram mais solúveis em água (62%) e menos solúveis em etanol (14% para os filmes contendo sericina). Para um mesmo solvente, as solubilidades dos filmes foram semelhantes (Tabela 3).

Tabela 3 – Solubilidade dos filmes AM-PVA-SS e AM-PVA.

Solventes	Solubilidade (%) dos Filmes	
	AM-PVA-SS	AM-PVA
Água	62,27 ± 6,93 ^a	61,54 ± 2,05 ^a
n-Heptano	25,03 ± 9,62 ^b	20,44 ± 5,96 ^b
Etanol	13,91 ± 0,29 ^b	20,35 ± 5,36 ^b

Fonte: Autoria Própria.

Matematicamente parece haver diferença, mas nenhum teste de média confirmou isso. Ou seja, a solubilidade é estatística e significativamente maior para os filmes imersos em água do que em solventes orgânicos. O comportamento é o mesmo tanto para o filme com sericina quanto para o controle (sem sericina).

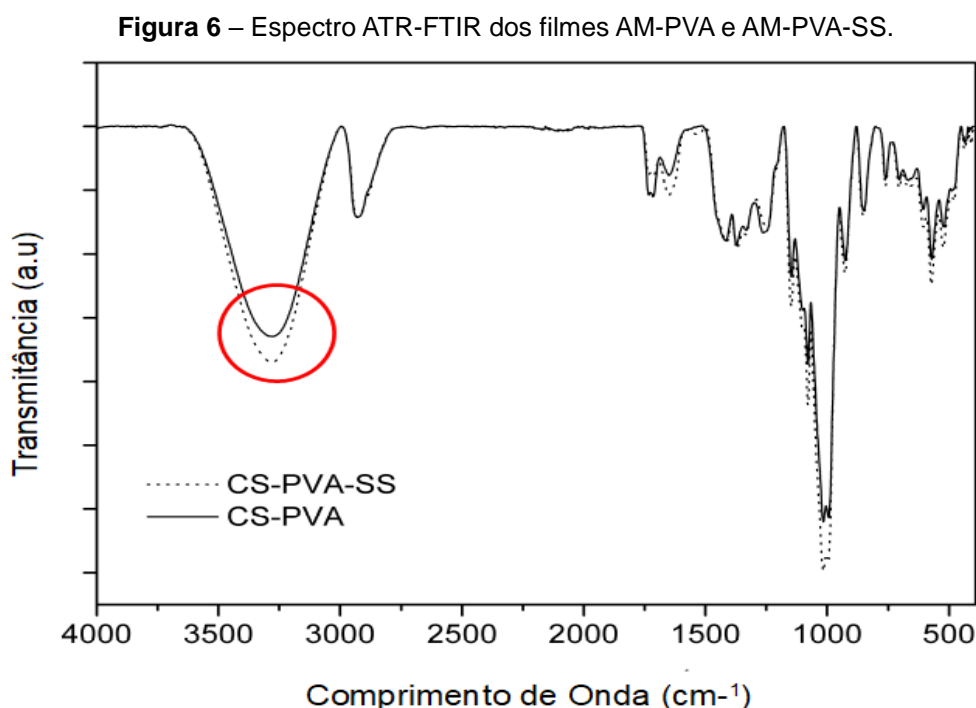
No espectro FT-IR-ATR dos filmes SS e Controle (sem sericina) (Figura 6), a banda alargada na região de 3500 cm⁻¹ pode ser atribuída tanto ao estiramento de grupos hidroxila (OH) do amido em interações/associações de hidrogênio, quanto ao estiramento de ligações NH presentes na cadeia polipeptídica (sericina). A sobreposição destas bandas de absorção poderia explicar por que o espectro do

filme SS apresentou intensidade relativamente maior quando comparado ao filme controle nesta mesma região de absorção (3500cm^{-1}).

A banda de estiramento de ligação C=O (carbonila) que geralmente ocorre na região de 1700cm^{-1} , não foi observada em nenhum dos espectros, o que era esperado para o filme controle, mas em função da composição química da cadeia polipeptídica, esta banda poderia ser observada no espectro do filme SS. A ausência desta banda também no espectro do filme SS poderia indicar interação entre o grupo carbonila (polar) e os grupos hidroxila do amido, inviabilizando a vibração da ligação que causaria o estiramento na região de 1700cm^{-1} .

Tanto no filme SS quanto no filme C foram observadas banda de absorção de estiramento de ligação C-O na região de $1100\text{-}1000\text{cm}^{-1}$. Tais ligações estão presentes em abundância em todas as cadeias poliméricas dos constituintes das blendas que deram origem aos filmes.

Duas bandas são características da estrutura da sericina. Estiramento C=O de amida I próximo à 1650cm^{-1} e deformação de ligação N-H (amida II) na região de 1520cm^{-1} . Nenhuma destas duas bandas foram observadas no espectro do filme SS, possivelmente em razão da baixa concentração de sericina presente no filme quando comparado aos demais polímeros (amido e PVA).



Fonte: Autoria Própria.

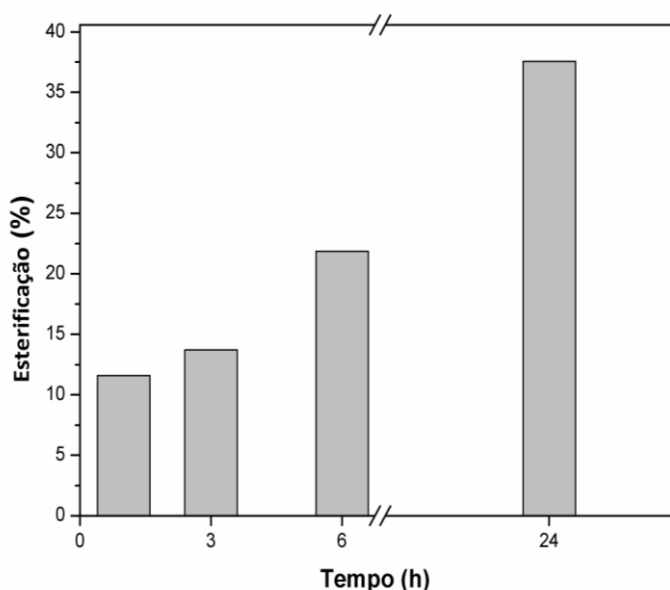
5.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Com base na Equação 2 (item 4.3) após imobilizar a lipase de *B. ribis* no filme AM-PVA-SS, observou-se retenção da atividade (método *p*NPP) de 987% sendo a atividade observada $0,8 \pm 0,07$ U mg^{-1} e a atividade teórica $0,052$ U mg^{-1} . Valores de retenção da atividade que apresentam valores acima de 100% indicam que houve uma hiperativação da enzima durante o processo de imobilização que pode estar associada à conformação aberta da enzima (mais ativa). O valor de 987% evidencia que o processo de imobilização empregado foi benéfico, não causando desnaturação da proteína e justifica a aplicação da enzima imobilizada em outras reações além da hidrólise do *p*NPP (GRICAJEVA *et al.*, 2018).

5.3 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Além da reação de hidrólise em meio aquoso, a lipase imobilizada foi empregada na síntese de oleato de etila em *n*-heptano. As condições para o primeiro teste foram: Razão Molar (RM) 1:2 (473 μL de ácido oléico, 1,5 mmol), (175 μL de etanol, 3 mmol), 75 U de enzima, 10 mL de *n*-heptano, 37 °C, 150 rpm sendo a cinética acompanhada nos intervalos de 0, 1, 3, 6 e 24 h (Figura 7).

Figura 7 – Cinética da síntese do oleato de etila catalisada por lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.



Fonte: Autoria Própria.

Os resultados mostram rendimento em éster diretamente proporcional ao tempo de reação, ou seja, maior em 24 h (38%) sendo provável um maior rendimento para maiores tempos. A partir deste resultado, a síntese catalisada pela lipase imobilizada foi estudada por delineamento fatorial 2^3 fixando o tempo de reação em 24 h, conforme parâmetros apresentados nas Tabelas 1 e 4.

Para os ensaios dos planejamentos fatoriais, os contrastes (efeitos principais e secundários) foram calculados a partir da Tabela 4 (primeiro planejamento fatorial) e Tabela 6 (segundo planejamento fatorial), utilizando a Equação 3 (item 4.4.1).

Tabela 4 – Resultados dos experimentos realizados por planejamento fatorial 2^3 aplicado na síntese de oleato de etila catalisada por lipase EC-01 de *Botryosphaeria ribis* imobilizada em filme de AM-PVA-SS.

EXPERIMENTO	TEMPERATURA (°C)	UNIDADES TOTAIS (U)	RAZÃO MOLAR (RM)	Ester (%) 24 h
1	30	100	1:3	3,2
2	30	50	1:3	13
3	44	100	1:1	12
4	44	50	1:1	25
5*	37	75	1:2	27
6	44	100	1:3	39
7	30	50	1:1	15
8	44	50	1:3	36

9 30 100 1:1 13

*O experimento 5 foi realizado em triplicata, permitindo o cálculo do desvio padrão (5) para o ponto central

Fonte: Autoria Própria.

Considerando o primeiro planejamento, o experimento 5 se refere à triplicata do ponto central, e o desvio calculado foi de $\pm 5\%$. Este desvio foi aplicado para todo o conjunto de experimentos. As melhores condições de reação alcançaram rendimentos de 36% e 40% para os experimentos 6 e 8 respectivamente.

Tabela 5 – Coeficientes de Contraste (Ci) (pontos percentuais para a conversão do éster) calculados a partir do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 4).

Variáveis	Ci (%)
T	+17
U	-5
RM	+6
T x U	+0,5
T x RM	+12
U x RM	+2
T x U x RM	+6

Variáveis independentes T= Temperatura; U= Unidades totais de enzima; RM= Razão Molar ácido:álcool/ Variáveis combinadas TxU= Temperatura + Unidades totais de enzima; TxRM= Temperatura + Razão Molar; UxRM= Unidades totais de enzimas + Razão Molar; TxUxRM= Temperatura + Unidades totais de enzima + Razão Molar

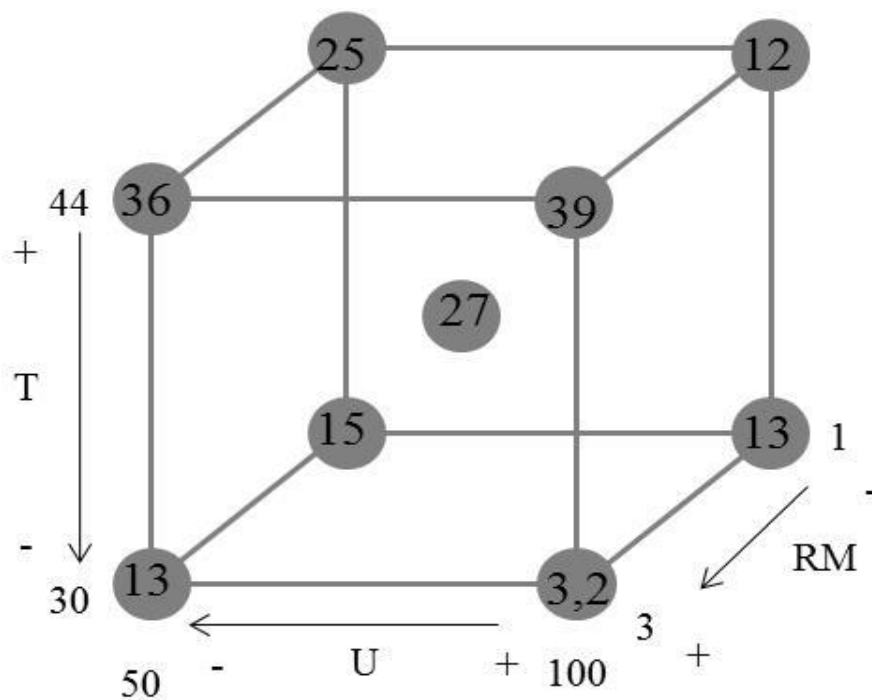
Fonte: Autoria Própria.

Em relação aos resultados dos contrastes (Tabela 5), o efeito individual importante foi o da temperatura com 17 pontos percentuais (p.p) positivos. Ou seja, quando a temperatura da reação é elevada de 30 °C para 44 °C a conversão em éster aumenta em 11 p.p. Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro T, altos valores são recomendados.

O efeito da razão molar foi considerado como não significativo, pois o valor do desvio padrão está muito próximo ao valor do contraste. Porém analisando os efeitos de segunda ordem, isto é, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, verificam-se valores significativos e positivos (+12) para a interação T e RM. Portanto, os resultados sugerem que os parâmetros estudados na esterificação

catalisada por lipase de *B. ribis* não devem ser avaliados isoladamente. Para facilitar esta análise, uma representação geométrica do sistema envolvendo as duas variáveis é apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Análise geométrica dos coeficientes de contraste da cinética da síntese do oleato de etila catalisada por lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em filme AM-PVA-SS.



Fonte: Autoria Própria.

Verificam-se na Figura 8, dois pontos de máxima (próximos a 40%) para os vértices posteriores direitos e esquerdo, que podem ser atingidos com enzima entre 100 e 50 U, razão molar 1:3 (ácido:álcool) e temperaturas de 44 °C. Em conclusão, as melhores condições para a produção do éster (40%, 24 h) obtidas a partir deste delineamento fatorial foram 44 °C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e 50 U.

Baseado nos resultados do primeiro planejamento fatorial, realizou-se outros experimentos utilizando um planejamento fatorial 2^2 , levando em consideração os parâmetros temperatura e razão molar, fixando a quantidade de enzimas totais (U) em 50 U (Tabelas 2 e 6).

O experimento 3 se refere à triplicata do ponto central, e o desvio calculado foi de ± 6 . Este desvio foi aplicado para todo o conjunto de experimentos. Para a melhor condição (experimento 2) o rendimento foi de 72%.

Tabela 6 – Resultados dos experimentos realizados por planejamento fatorial 2^2 aplicado na síntese de oleato de etila catalisada por lipase EC-01 de *Botryosphaeria ribis* imobilizada em filme de AM-PVA-SS.

EXPERIMENTO	TEMPERATURA (C°)	RAZÃO MOLAR (RM)	Ester (%) 24 h
1	44	1:3	48
2	54	1:3	72
3*	49	1:4	25
4	44	1:5	0,0
5	54	1:5	23

*O experimento 3 foi realizado em triplicata, permitindo o cálculo do desvio padrão (6) para o ponto central

Fonte: Autoria Própria.

De acordo com os segundo planejamento fatorial, analisando os experimentos 1 e 2, onde a temperatura vai de 44 (-1) para 54 °C (+1) e a razão molar está fixada no nível -1 (1:3), o rendimento em éster aumenta de 48 para 72%, ou seja $C_i +23$ p.p. Em contrapartida, analisando os experimentos 2 e 5 onde a temperatura está fixada no nível +1 e a razão molar vai de 1:3 (-1) para 1:5 (+1), o rendimento decresce de 72 para 23% ($C_i -49$ p.p). Desta forma, para maximizar a resposta (rendimento em éster), levando-se em consideração os resultados do segundo planejamento fatorial, temperaturas igual ou superior a 54 °C e Razão molar próximo a 1:3 são recomendadas. Analisando estudos anteriores, observou-se que a lipase de *B. ribis* EC-01 mostrou uma temperatura ideal a 55 °C, porém reteve 65% de sua atividade inicial após 30 minutos de incubação (60 °C) (método pNPP) (ANDRADE *et al.* 2013)

Por isso, por razões econômicas e pela possibilidade de um maior número em reutilizações da enzima imobilizada, optou-se pelo uso da temperatura 49 °C (ponto central) e da razão molar ácido oleico/etanol no nível mais baixo 1:3. A reação foi monitorada em intervalos de 24, 30 e 48 h, a fim de maximizar a conversão de éster. Os resultados mostraram 95% de conversão em 30 horas, e não houve diferença entre 30 e 48 horas.

5.4 ESTUDO COMPARATIVO DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO A ENZIMA LIVRE E A ENZIMA IMOBILIZADA

Para comparar a eficiência catalítica da enzima imobilizada, uma reação de síntese de oleato de etila foi realizada seguindo as mesmas condições da reação otimizada (T 49 °C, RM 1:3, 50 U), porém utilizando a enzima livre (extrato bruto liofilizado). Esta reação foi realizada em triplicata, sendo os rendimentos de reação de 21% ± 5 (24 h) e 68% ± 12% (48 h). Os rendimentos obtidos com enzima imobilizada (95%; 30 h) foram superiores aos da enzima livre e justificam o processo de imobilização.

Outros autores também obtiveram melhor eficiência catalítica quando utilizaram a enzima imobilizada.

Kharrat *et al.* (2011), imobilizaram lipase de *Rhizopus oryzae* em aerogéis de sílica por adsorção física para aplicação em reação de síntese de oleato de *n*-butila. Os autores relatam que a enzima imobilizada apresentou alta tolerância ao solvente apolar empregado no trabalho (*n*-hexano) e manteve sua atividade por 4 meses de armazenamento a 4 °C. Segundo os autores, o rendimento máximo de reação obtido na conversão do oleato de *n*-butila foi de 80% com a enzima imobilizada e 35% para a enzima livre. As condições da reação de esterificação foram de 37 °C, RM 1:1 (ácido oleico/ *n*-butanol) e 450 U de lipase imobilizada. A enzima imobilizada pode ser reutilizada por 12 vezes sem que houvesse perdas significativas de sua atividade catalítica.

Enayati *et al.* (2018) sintetizaram ésteres de ácido graxos de lactose catalisados por lipase de *Candida antarctica* B (CALB) em solventes orgânicos (*n*-hexano, acetona, *t*-butanol, acetato de etila, tetra-hidrofurano e acetonitrila) imobilizada em *Immobead* 150, Novozyme 435. Os melhores resultados foram obtidos para as reações em *n*-hexano e acetonitrila (77% lipase livre; 93% enzima imobilizada).

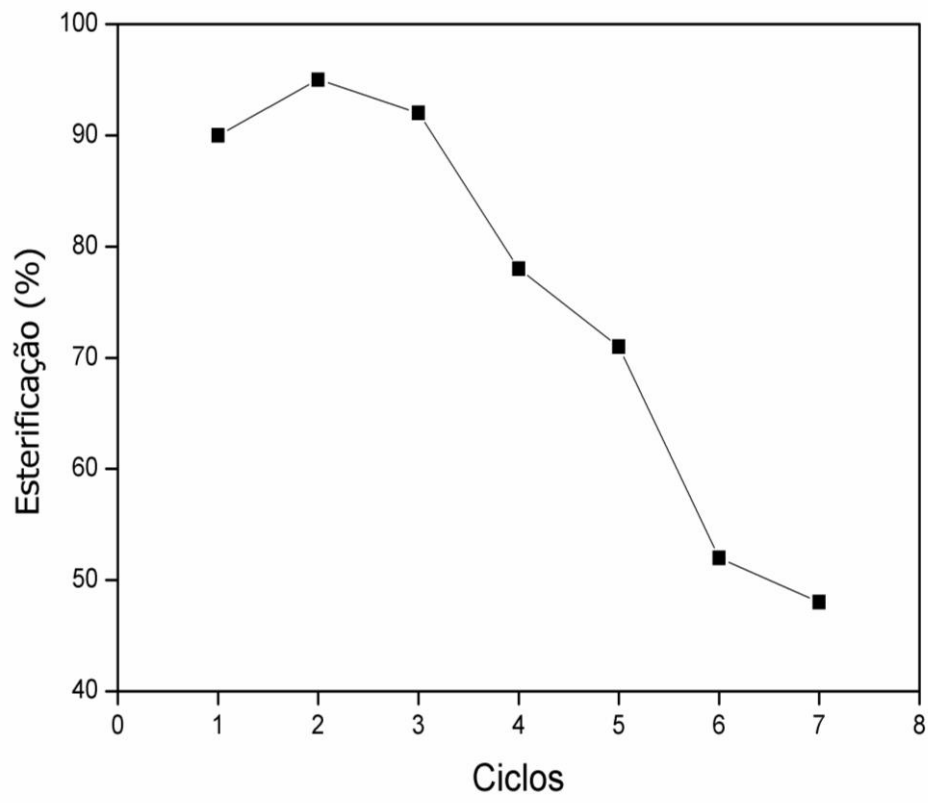
Fatores difusionais, causados pela formação de agregados das enzimas na forma liofilizada quando em meio orgânico, justificaria a menor eficiência catalítica destes preparados enzimáticos (PERSSON *et al.*, 2002).

5.5 REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Tendo-se otimizado as condições de reação, o reuso de lipase na síntese de oleato de etila foi estudado como um dos principais objetivos deste trabalho, assim como umas das principais vantagens das enzimas imobilizadas. Aplicando-se as mesmas condições em todas as reutilizações (T 49 °C, RM 1:3, 50 U, 30 h). Os resultados obtidos (Figura 9) mostram que a enzima foi reutilizada três vezes sem perda de eficiência catalítica, sendo que a conversão em éster foi de 70% e 48% na quarta e sétima reutilização, respectivamente.

Analisando os resultados deste trabalho em relação a outros que utilizaram a sericina (SS) na composição do suporte enzimático (Quadro 1, item 3.3), observa-se que os resultados obtidos acompanham os citados na literatura. As vantagens do método de imobilização empregado neste trabalho (adsorção) estão relacionados ao baixo custo e de facilidade de execução que, no caso específico, permitiu reutilizações do catalisador, além de não gerar resíduos que possam agredir o meio ambiente quando descartados. Em contrapartida, uma desvantagem do método é a dessorção da enzima imobilizada conforme o material é reutilizado, o que limita a vida útil do material, ou seja, quando se atinge rendimentos de reações em torno de 50%, não justifica a reutilização da enzima imobilizada.

Figura 9 – Reutilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em filmes de AM-PVA-SS em reações de síntese do oleato de etila. Condições: razão molar 3 de etanol (225 mmol L⁻¹), 75 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 1,25 g de enzima imobilizada, 49 °C, 150 rpm, 30 h.



Fonte: Autoria Própria.

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram concluir que:

(I) Produção e caracterização do filme

- ✓ Os filmes AM-PVA-SS apresentaram maior alongamento, porém menor resistência quando comparados ao filme controle (AM-PVA; sem sericina);
- ✓ Os filmes AM-PVA-SS foram mais solúveis em água (62%) e menos solúveis em etanol (14%). Para um mesmo solvente, as solubilidades dos filmes com e sem sericina foram semelhantes;
- ✓ Os espectros de FTIR dos filmes foram semelhantes, porém para o filme AM-PVA-SS houve maior intensidade da banda na região de 3650 a 3000 cm^{-1} quando comparado com o filme AM-PVA. A maior intensidade nesta banda indica que houve uma maior interação de hidrogênio entre a estrutura do filme AM-PVA-SS, o que justificaria a maior flexibilidade do filme.

(II) Estudos de Imobilização

- ✓ A imobilização por adsorção utilizando a técnica sanduíche foi eficiente, pois a retenção da atividade foi superior a 100%. A enzima imobilizada foi aproximadamente 10 vezes mais ativa que a enzima livre em reações de hidrólise do pNPP.

(III) Aplicação da lipase na síntese do oleato de etila

- ✓ A enzima imobilizada apresentou eficiência catalítica superior à enzima livre quando utilizadas na síntese do oleato de etila em condições semelhantes. O rendimento em éster foi de 21% \pm 5 (24 h) e 68% \pm 12% (48 h) para a enzima livre e 95% (30 h) para a enzima imobilizada;
- ✓ Para as condições otimizadas (Rendimento de 95%, 49 °C; RM 1:3 ; 50 U; 30 h), a enzima imobilizada foi reutilizada em reações de síntese de oleato

de etila por 7 vezes, sendo as 3 primeiras reutilizações sem perdas na atividade da enzima imobilizada (rendimento em éster próximo a 95%), tendo atingido rendimento de 48% de conversão em éster na sétima reutilização.

Portanto, os resultados indicaram que o filme AM-PVA-SS, biodegradável e biorenovável, é um suporte promissor para imobilizar lipases e aplicação em biocatálise.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações**. 2013. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, 2013.

ANDRADE, M. M. *et al.* Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1792-1806, 2013.

ARAMWIT, P.; SIRITIENTONG, T.; SRICHANA, T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. **Waste Management & Research**, v. 30, n. 3, p. 217-224, 2007.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.

BARAJAS-GAMBOA, J. A. *et al.* Aplicaciones de la sericina: una proteína globular proveniente de la seda. **Ingeniería y Competitividad**, v. 18, n. 2, p. 193-206, 2016.

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para utilização em Biocatálise**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BATISTA, K. A. *et al.* Lipase entrapment in PVA/Chitosan biodegradable film for reactor coatings. **Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl**. v. 33, p. 1696–1701, 2013.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22 (2019).

BON, E. P. S; FREIRE, D. M. G.; MENDES, M. F.; SOARES, V. F. Immobilization of *Aspergillus niger* beta-D-glucosidase on Aminates Chitin and Aluminate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 11, p. 291-299, 1986.

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.

CAO, T. T.; ZHANG, Y. Q. Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 940-952, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MORAES, M. C. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CASTRO, M. C. *et al.* Imobilização de lipases em filmes contendo sericina para utilização em biocatálise. In: **VI Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, UEL, Londrina, 2017.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

ENAYATI, M. *et al.* Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. **Food chemistry**, v. 266, p. 508-513, 2018.

GARCIA, P. S. *et al.* Citric acid as multifunctional agent in blowing films of starch/PBAT. **Química Nova**, v. 34, p. 1507-1510, 2011.

GRICAJEVA, A. *et al.* Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1165-1175, 2018.

HE, H. *et al.* Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 457-464, 2017.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

JOSHI, M.; GULRAJANI, M. L.; BAR, M. Novel cross linked sericin films: Characterization and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 5, 2015.

KHARRAT, N. *et al.* Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083-1089, 2011.

KUNDU, B.; KUNDU, S. C. Silk sericin/polyacrylamide in situ forming hydrogels for dermal reconstruction. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7456-7467, 2012.

LEE, K. H. *et al.* Sericin-fixed silk fiber as an immobilization support of enzyme. **Fibers and Polymers**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2005.

LIMA, V. M. G *et al.* Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 1-3, p. 53-61, 2004.

LIU, M. D; CHEN, J.; SHI, P. Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

OH, H.; LEE, K. H. Activity and stability of immobilized enzyme on silk sericin bead. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 27, n. 2, p. 329-332, 2013.

OH, H. *et al.* Preparation of silk sericin beads using LiCl/DMSO solvent and their potential as a drug carrier for oral administration. **Fibers and Polymers**, v. 8, n. 5, p. 470-476, 2007.

PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P. Silk sericin and its applications: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 4, p. 323-329, 2004.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

PAULA, A. V. *et al.* Comparative performance of *Candida rugosa* lipase immobilized on polysiloxane polyvinyl alcohol hybrid support using different methodologies. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. dos S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PELLIS, A. *et al.* Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, v. 40, p. 154-169, 2018.

PERSSON, M. *et al.* Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enz. Microbial Technology**, v. 31 (6), p. 833-841, 2002.

PURE SERICIN™ LABO. Protection by Power of Cocoon, 2019. Página inicial. Disponível em: <<https://www.puresericin.com/en/>>. Acesso em : 15 de set de 2019.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

SANTANA, A. C. T. *et al.* Imobilização de Lipases em Biofilmes de Sericina para Utilização em Biocatálise. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 154-157, 2013.

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

TURBIANI, F. R. B. *et al.* Properties and structure of sericin films: Effect of the crosslinking degree. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 1489-1494, 2011.

VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, P. *et al.* Cross-linking of dialdehyde carboxymethyl cellulose with silk sericin to reinforce sericin film for potential biomedical application. **Carbohydrate polymers**, v. 212, p. 403-411, 2019.

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

WU, S. *et al.* Plasma-modified biomaterials for self-antimicrobial applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 8, p. 2851-2860, 2011.

YUN, H. *et al.* The role of glycerol and water in flexible silk sericin film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 945-951, 2016.

ZHANG, Y. Q. *et al.* Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3751-