



MODIFICAÇÃO DE SUPORTES DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) OBTIDOS POR IMPRESSORA 3D PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE*

B. F. IZIDORO¹, V. T. MAZZIERO¹, M. O. CERRI¹, R. F. C. MARQUES², A. V. DE PAULA¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

² Universidade Estadual Paulista, Departamento de Físico-química

E-mail para contato: barbara_izidoro@hotmail.com, ariela@fcfar.unesp.br

RESUMO – Atualmente, o poli (ácido láctico) é um poliéster que vêm sendo amplamente utilizado na confecção de objetos sólidos tridimensionais com dimensões e estruturas desejadas. Nesse contexto, esta pesquisa visou imprimir, em impressora 3D, suportes de PLA para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* por ligação covalente. Para isso, foi preciso incorporar aos suportes, grupos amino livres para a ligação da lipase, determinando-se as melhores condições para o processo de imobilização enzimática. Em seguida, realizou-se o teste de ninidrina e análise de ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmar a incorporação desses grupos. Observou-se que o suporte submetido a 2 horas de reação de aminólise, teve sua estrutura comprometida. No teste de ninidrina, verificou-se que a melhor condição para a reação de aminólise seria 15 minutos de reação e 60 mg/ml de hexametilenodiamina. Além disso, a análise de RMN confirmou a incorporação dos grupos amino, através do surgimento de picos nas regiões dos prótons -CH₃ e -CH do lactilo hidroxilado, em 1,51~1,52 (a) e 4,40~4,36 ppm (b), e dos prótons C₂H₄ da hexametilenodiamina, em 4,07 ~ 4,03 ppm (e) no PLA modificado. Ademais, verificou-se a maior atividade hidrolítica para o derivado imobilizado triturado, modificado com 1% de glutaraldeído (90,9640 e 61,6024 U/g).

INTRODUÇÃO

O poli (ácido láctico) ou PLA é um poliéster alifático e semicristalino com alto potencial para substituir polímeros de origem petroquímica. Apresenta alta resistência, além ser o primeiro polímero a ser produzido a partir de recursos não tóxicos e renováveis. Esse polímero apresenta diversas aplicações, desde a manufatura de embalagens, até a fabricação de protótipos ou dispositivos médicos bioabsorvíveis. Além disso, por ser um material termoplástico e de fácil processamento, pode ser aplicado em impressora 3D na produção de diferentes tipos de peças moldadas (FARAH *et al.*, 2016).

Uma impressora 3D é um equipamento utilizado para transformar filamentos termoplásticos (como o PLA) em objetos sólidos 3D, projetados em programa CAD. Para isso, uma bobina é acionada e o filamento lá contido é desenrolado e aquecido por um bico extrusor. O termoplástico será fundindo sobre a mesa da impressora, numa deposição de camada sobre camada, até a completa impressão da peça desejada (BESKO *et al.*, 2017).



Essa tecnologia tem como principal vantagem a diminuição de desperdícios, consumo de matérias-primas e de energia, além de não emitir resíduos, ruídos, ou substâncias tóxicas durante o processo de impressão. Ademais, pode ser aplicada na impressão de objetos como capas para celulares e peças de automóveis, até órgãos humanos com células vivas e na confecção de matrizes para imobilização enzimática (PORTO, 2016)

Nesse contexto, o presente projeto teve por objetivo imprimir, em impressora 3D, diferentes suportes de PLA e empregá-los como suporte para imobilização de lipase. Para isso, os suportes foram modificados a fim de possibilitar a ligação covalente da enzima em sua superfície. Através da reação entre os grupos éster do PLA e os grupos amino da hexano diamina foram produzidos grupos amino livres (PLA-NH₂) aos quais a lipase irá se ligar.

2. METODOLOGIA

2.1 Impressão 3D

Os suportes de poli (ácido láctico), desenhados em programa CAD e impressos em impressora 3D, foram projetados a fim de maximizar a superfície de contato entre enzima e suporte, através da elaboração de pequenos poros ao longo de toda a extensão do mesmo.

2.2 Reação de Aminólise

Para incorporação de grupamentos amina nos suportes de PLA empregou-se a metodologia descrita por ZHU *et al.*, (2004) com adaptações a fim de determinar as melhores condições para a reação de aminólise. Para isso, realizaram-se diferentes sínteses, com três amostras cada, na primeira, os tempos de reação empregados foram de 5, 8 e 15 min e na segunda síntese e 15, 45 min e 2 horas, sendo que a concentração de hexametilenodiamina testada foi de 6 e 60 mg/ml, para ambas as sínteses.

2.3 Teste de Ninidrina

A fim de confirmar a incorporação dos grupamentos amina no suporte de PLA, este foi imerso em solução de ninidrina 0,5 mg/ml, durante 5 minutos de fervura, para detecção de aminas primárias, a partir do aparecimento da coloração roxa no suporte.

2.4 Teste RMN

A análise de ressonância magnética nuclear, proposta por LAVERTU *et al.*, (2003), com modificações quanto às concentrações dos reagentes e o polímero utilizado foi empregada na caracterização do suporte modificado.

2.5 Ativação do Suporte para imobilização por ligação covalente

Para obtenção do suporte ativado com glutaraldeído empregou-se a metodologia descrita por BASSAN *et al.*, (2016). Para verificar a influência do aumento da superfície de contato no processo de imobilização da enzima, uma parte dos suportes foi triturada em liquidificador. Além disso, variou-se a concentração de glutaraldeído em 1% e 10%.

2.6 Imobilização dos Suportes Ativados com Glutaraldeído

Para cada grama seca de suporte ativado, foram adicionados 20 mL de solução de lipase (25 mg/mL) em tampão fosfato 0,1 mol/L e pH 7. Os suportes foram mantidos sob agitação suave, em agitador magnético, por 24 horas para a imobilização da lipase *Rhizopus oryzae*.

2.7 Atividade Hidrolítica do Derivado Imobilizado

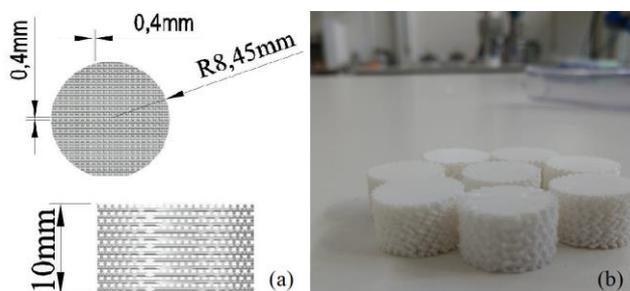
A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de retrotitulação descrito por PAULA (2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Impressão 3D

A figura 1 apresenta o desenho do suporte em programa CAD, com suas dimensões representadas por cotas, e uma imagem tirada após sua impressão em impressora 3D.

Figura 1 – Representação do suporte de PLA projetado em CAD com suas dimensões expressas por cotas (a). Imagem dos suportes impressos em impressora 3D (b)



3.2. Reação de aminólise e teste de Ninidrina

Após as reações de aminólise no suporte de PLA, verificou-se que os suportes mantidos à 55° durante o tempo de reação de 2 horas tiveram sua estrutura prejudicada. As amostras restantes foram imersas em solução de ninidrina para confirmar a presença de grupamentos amina. A partir da figura 2, verificou-se que a maior quantidade de grupamentos amina, foi a amostra de maior concentração (60 mg/ml) e tempo de reação (15 minutos).

Figura 2 - Aparecimento de coloração roxa nos suportes de PLA modificados.

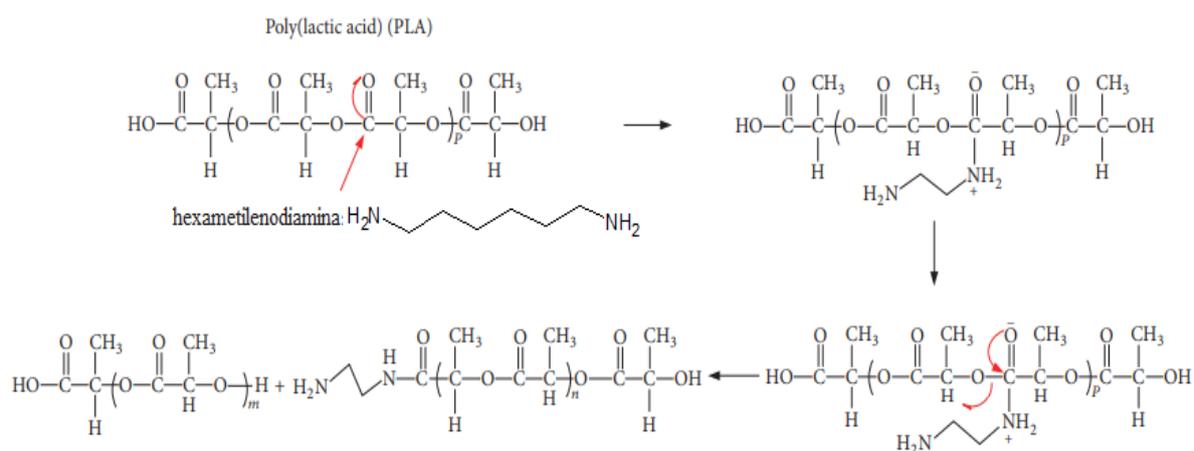




3.3. Teste RMN

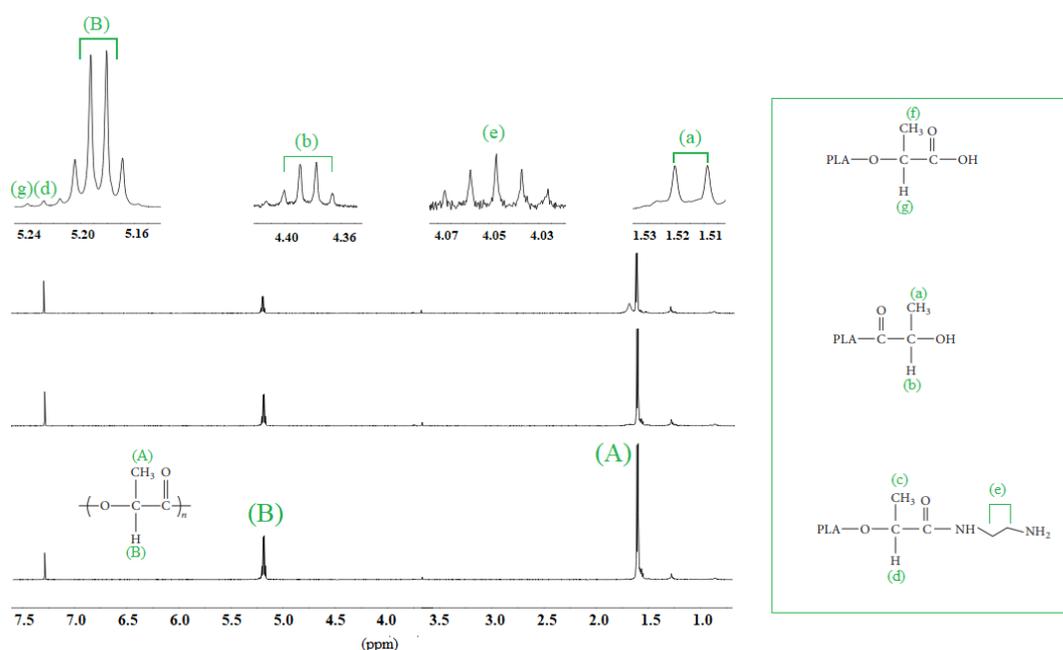
O mecanismo da reação de aminólise realizado neste trabalho é apresentado na Figura 3 a seguir.

Figura 3 - Mecanismo da reação de aminólise no poli (ácido láctico) com hexametilenodiamina (YU *et al*, 2018).



A caracterização dos suportes por RMN apresentou sinais distintos. A figura 4 a seguir apresenta os principais picos obtidos para os suportes de PLA não modificado (branco) e modificados em 15 e 45 minutos de reação.

Figura 4 - Região dos picos obtidos pela análise de RMN para o PLA não modificado e modificado (15 e 45 min). Fonte: autor.



Verificaram-se sinais na faixa de 1,60~1,61 (A) e 5,17~5,20 ppm (B), referentes aos prótons $-CH_3$ e $-CH$ do PLA. Após a modificação, surgiram novos picos, de 1,51~1,52 (a) e 4,40~4,36 ppm (b), pertencentes aos prótons $-CH_3$ e $-CH$ do lactilo hidroxilado. Picos em 5,23 (d) e 1,61 ppm (c) atribuídos a $-CH$ e $-CH_3$ conectados à hexametilenodiamina. Além disso, picos dos prótons C_2H_4 da hexametilenodiamina aparecem em 4,07 ~ 4,03 ppm (e) e do $-CH$ e $-CH_3$ do lactilo carboxilado, em 5,25 (g) e 1,54 ppm (f). Neste contexto, Yu *et al.* (2018), visando sintetizar copolímeros a partir de PLA aminolizado, obteve picos em regiões muito semelhantes ao desta pesquisa. Assim, os resultados obtidos na análise de RMN confirmaram a proposta do mecanismo de aminólise representado na figura 3.

3.4. Atividade Hidrolítica do Derivado Imobilizado

Os valores de atividade obtidos para os suportes, peça e pó, imobilizados com a lipase de *Rhizopus oryzae* são apresentados na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Valores de atividade hidrolítica obtidos para o PLA na forma de peça e triturado.

Suporte	Atividade amostra 1 (U/g)	Atividade amostra 2 (U/g)
Peça PLA - 1% glutaraldeído	25,0336	-
Peça PLA- 10% glutaraldeído	17,6786	-
PLA pó - 1% glutaraldeído	90,9640	61,6024
PLA pó - 10% glutaraldeído	20,4734	10,1665

Verificaram-se maiores valores de atividade para o suporte triturado com 1% de glutaraldeído. Júnior (2007), ao variar a concentração de glutaraldeído de 1 a 10%, na imobilização da lipase de *Candida antarctica*, obteve resultados próximos aos deste trabalho, com atividade máxima na concentração de 3% do reagente. Isso se deve à alta reatividade do glutaraldeído, que, em grandes concentrações, gera distorções no sítio ativo da enzima e má orientação da mesma durante a imobilização (MENDES, 2009).

4. CONCLUSÃO

A partir da variação de parâmetros durante o processo de modificação e do teste de ninidrina realizado com os suportes de PLA, foram estabelecidas, como as melhores condições para a reação de aminólise, o tempo de 15 minutos de reação empregando uma concentração igual a 60 mg/ml de hexametilenodiamina. Além disso, tanto o teste de ninidrina quanto a análise de RMN confirmaram a incorporação dos grupamentos amina na superfície do PLA, indispensáveis para a imobilização da lipase. Ademais, concluiu-se a maior atividade obtida foi para o PLA triturado e ativado com 1% de glutaraldeído.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Processo 2017/11482-7).



6. REFERÊNCIAS

- BASSAN, C. J.; SOUZA, B. M. T.; PEIXOTO, G.; CRUZ, P. Z. C.; GALÁN, M. P. J.; VAZ, S. B. A.; GARRIDO, S.S.; FILICE, M.; MONTI, R. Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potencial from whey protein. *Materials*, v. 9, n. 5, 2016.
- BESKO, M.; BILYK, C.; SIEBEN, P. G. Aspectos técnicos e nocivos dos principais filamentos usados em impressão 3D. *Gestão, Tecnologia e Inovação*, v. 01, p. 9-18, 2017.
- FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and Mechanical Properties of PLA, and Their Functions in Widespread Applications- A Comprehensive Review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 367–92, 2016.
- JÚNIOR, A. C. imobilização de lipase de candida antarctica b em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona. 2007. 107 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. 2007.
- LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003.
- MENDES, A. A. Seleção de suportes e protocolo de imobilização de lipase para síntese enzimática de biodiesel. 2009. 194 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009.
- PAULA, A. V. Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.
- YU, W.; ZHU, L.; SHI, J.; ZHAO, C. Synthesis of Poly(lactic acid)-block-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) Copolymers with Controllable Block Structures via Reversible Addition Fragmentation Polymerization from Aminolyzed Poly(lactic acid). *International Journal of Polymer Science*. 2018.
- ZHU, Y.; GAO, C.; LIU, Y.; SHEN, J. Endothelial cell functions in vitro cultured on poly(L-lactic acid) membranes modified with different methods. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004.