

RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDROGÉIS DE GELATINA VISANDO A PRODUÇÃO DE SUBSTITUTOS VÍTREOS

Gustavo Munhoz Simão¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti¹
¹ Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI
 gumunhoz@outlook.com e preamorandim@fei.edu.br

Resumo: Neste trabalho foi otimizada a condição de crescimento do fungo *Stenocarpella maydis* isolado de caules de mandioca para produção de tirosinase (pH 7,68, 10,563 dias de cultivo, 32,03°C). Essa condição de cultivo levou a uma atividade específica de 0,905 µmol/mg. Esse extrato foi utilizado na reticulação de hidrogéis de gelatina, sendo estabelecida a condição ideal de reticulação (29,3°C, 0,67 mL de extrato enzimático, tempo de reação de 24h). Essa condição levou a um aumento de 17% na viscosidade do material polimérico.

1. Introdução

Estudos estão sendo realizados para a obtenção de novos substitutos vítreos como, por exemplo, hidrogéis. Neste contexto, destacam-se trabalhos que utilizam quitosana, alginato, colágeno, gelatina entre outros. Porém, para a produção desses materiais, existe a necessidade de realização de processos de reticulação do material sendo possível a utilização de processos químicos, físicos e biológicos como, por exemplo, aplicação de enzimas [1]. Para isso, são utilizadas enzimas como a peroxidase, tirosinase, lacase, etc sendo, a tirosinase, muito estudada devido a possibilidade de reticulação de diversas proteínas devido a presença de aminoácidos como lisina, histidina, cisteína e, tirosina [2]. Assim, no presente trabalho foi avaliada a produção de tirosinase por fungos associados a caules e folhas de mandioca e selecionado o extrato enzimático mais promissor que foi aplicado na obtenção de hidrogéis de gelatina, bem como as condições ideais de reticulação.

2. Metodologia

Fungos isolados de caules e folhas de mandioca (*Microdochium lycopodium*-CA1, *Alternaria* sp.-CA5, *Phomopsis* sp.-CA7, *Diaporthe phaseolorum*-CA8, *Diaporthe endophytica*-CA9, *Vouchered mycorrhizae*-CA10, *Phanerochaete australis*-CA11, *Diaporthe caatingaensis*-CA12, *Stenocarpella maydis*-CA13, *Annulohyphoxylon stygium*-CA14, *Sordariomycetes* sp.-CA15, *Phanerochaetaceae* sp.-CA17, *Cladosporium xanthochromaticum*-FO1 e *Xylaria* sp-FO2) foram repicados em meio batata dextrose agar sendo mantido o crescimento durante 7 dias à 24°C. Após a realização do terceiro repique, os fungos foram avaliados com relação a produção de tirosinase utilizando-se, para isso, L-tirosina, bem como através da determinação da concentração de proteínas utilizando-se o método de Bradford. Ambas as caracterizações foram feitas via espectroscopia UV/VIS.

O fungo CA13, que se mostrou promissor nos testes iniciais, foi submetido a um processo de indução para aumentar a produtividade da enzima de interesse. Dessa forma, o mesmo foi transferido para um meio de cultura

líquido com 2% de extrato de malte e 0,3% de L-tirosina, solubilizados em tampão fosfato de sódio, com variação de pH, tempo e temperatura de crescimento. Após otimizar a produção do extrato enzimático rico em tirosinase, foi otimizada a produção de hidrogéis de gelatina sendo monitorada a viscosidade do produto final. Para isso, diferentes volumes de extrato enzimático foram adicionados ao sistema, que foi mantido sob agitação constante a diferentes temperaturas por 24 horas. Finalmente, o produto foi caracterizado pela determinação da viscosidade a 36°C.

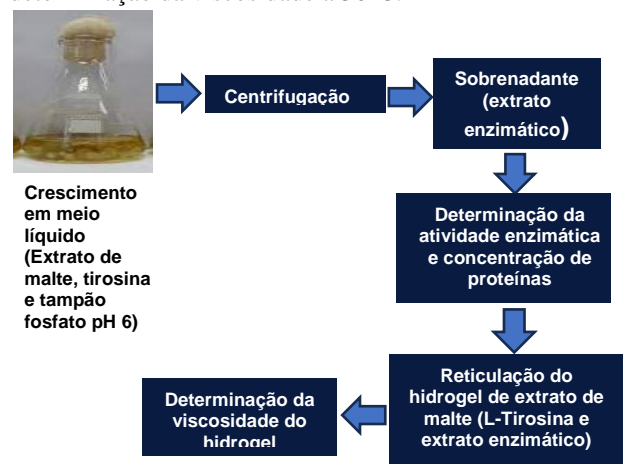


Figura 1 – Fluxograma do processo de estudo

3. Resultados e Discussões

A análise dos extratos enzimáticos obtidos a partir de cada fungo mostrou a maior produção de tirosinase pelo fungo CA13 (Figura 1) sendo que, após a realização do crescimento do mesmo modificando-se as condições de cultivo, verificou-se que o fungo mostrou uma maior produção de tirosinase em pH próximos a 7 ou básicos utilizando-se tempos superiores a 8 dias bem como temperaturas abaixo de 35°C (Figura 2).

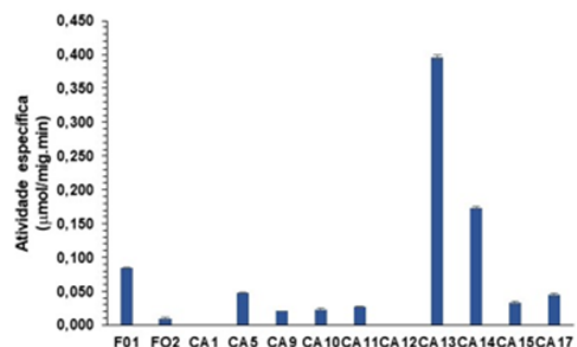


Figura 2 – Seleção do fungo produtor de tirosinase

Através da função de desejabilidade (Figura 3) foi possível estabelecer a condição ideal de cultivo do fungo para maximizar a produção de tirosinase pH7,68, 11 dias de cultivo à 32°C (Figura 4). Dessa forma, foi realizado um novo cultivo nessa condição visando a obtenção de um extrato enzimático enriquecido em tirosinase que foi aplicado na produção de hidrogéis.

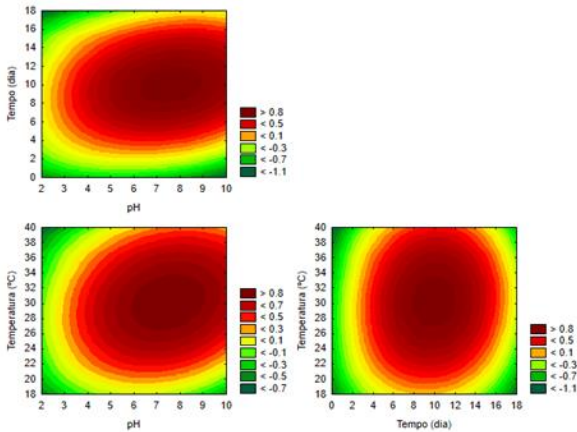


Figura 3 – Avaliação da produção de tirosinase em função da condição de tratamento.

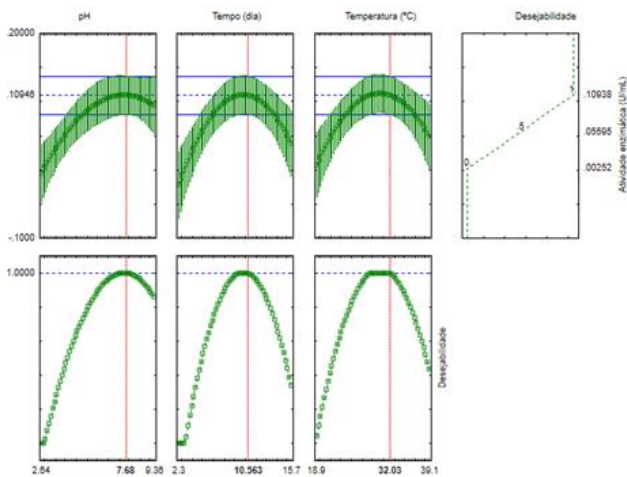


Figura 4 – Otimização da condição de produção de tirosinase.

Após a produção da enzima na condição otimizada, foi feita a otimização da produção dos hidrogéis de gelatina. Analisando-se as superfícies de contorno (Figura 4) e o gráfico de função de desejabilidade (Figura 5), verifica-se que a utilização de uma temperatura de 29°C e 0,67 mL de enzima se mostrou a condição ideal de produção do hidrogel. Após a otimização das condições de obtenção do hidrogel, foi realizado um novo experimento utilizando a condição otimizada bem como experimentos sem a adição do extrato enzimático (Figura 6) sendo confirmada a necessidade do extrato enzimático no processo com aumento da viscosidade de aproximadamente 8%.

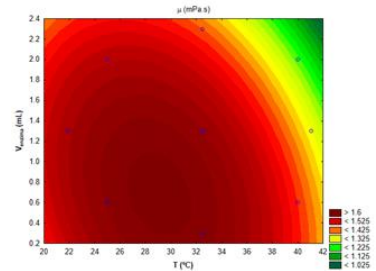


Figura 5 – Avaliação da produção do hidrogel em função da condição de reticulação.

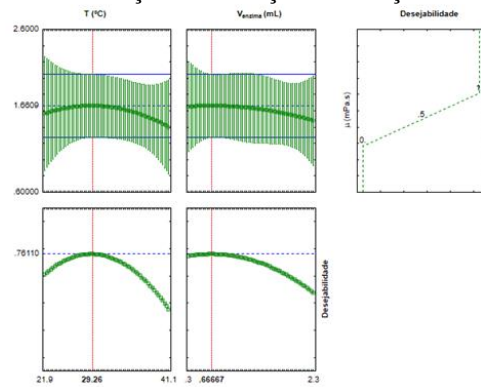


Figura 6 – Otimização da produção do hidrogel de gelatina.

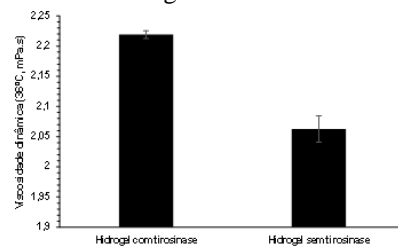


Figura 7 – Comparação das viscosidades do hidrogel produzido na presença e ausência de tirosinase.

4. Conclusões

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu a produção de tirosinase a partir de fungos endofíticos associados a resíduos de mandioca (caules) e a determinação das condições ideais para a reticulação de hidrogel de gelatina, com foco em substitutos vítreos. Isso resultou em avanços da produção de um produto dentro da área da saúde, não somente ampliando os conhecimentos científicos a respeito de processos biotecnológicos, mas também contribuindo para uma melhoria na saúde e qualidade de vida em termos gerais.

5. Referências

- [1] A. C. Alavarse et al., International Journal of Biological Macromolecules, 202 (2022) 558-596.
- [2] P. A. Bersanetti et al., European Polymer Journal, 112 (2019) 610-618.

Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pela concessão da bolsa.

¹Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 06/2023 a 05/2024.