

# **INFLUÊNCIA DO GRAU DE HIDROFOBICIDADE DE SUPORTES POLIMÉRICOS COM MORFOLOGIA CASCA-NÚCLEO NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica*(CAL-B)**

L. C. M. CIRILO<sup>1</sup>, M. C. C. PINTO<sup>2</sup>, D. M. G. FREIRE<sup>1</sup>, J. C. PINTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Engenharia Química/COPPE

E-mail para contato: pinto@peq.coppe.ufrj.br

**RESUMO** – O emprego de enzimas na forma imobilizada tem crescido nos últimos anos, em função, principalmente, da possibilidade de reutilização de tais enzimas. Dessa forma, objetivando desenvolver biocatalisadores mais eficientes, partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, apresentando diferentes graus de hidrofobicidade na casca, foram sintetizadas. Em uma etapa seguinte, tais partículas foram empregadas como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica*(CAL-B). Observou-se, então, que ao alterar a composição da casca durante a polimerização eram obtidas partículas com diferentes polaridades. Notou-se também que os biocatalisadores apresentaram maiores atividades de esterificação, quando suportes com maior caráter hidrofóbico foram empregados no processo de imobilização; possivelmente, em decorrência da maior exposição do sítio ativo das enzimas. No entanto, ao analisar as atividades de hidrólise dos biocatalisadores, percebeu-se também um aumento de atividade enzimática quando suportes mais hidrofílicos foram empregados, indicando a presença de limitações difusionais neste tipo de reação. Percebeu-se, assim, que o desempenho dos biocatalisadores produzidos dependem somente das características dos suportes empregados no processo de imobilização, mas também do meio reacional onde o biocatalisador é empregado.

## **1. INTRODUÇÃO**

A utilização de enzimas em processos industriais tem despertado grande interesse comercial, uma vez que as enzimas são catalisadores naturais e, muitas vezes, apresentam alta especificidade, seletividade e eficiência em condições reacionais brandas. Assim, as enzimas vêm sendo amplamente empregadas em diversos setores, como na área alimentícia, farmacêutica, química, têxtil, de biodiesel, dentre outras (Castro *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2014).

No entanto, há algumas desvantagens relacionadas ao emprego de tais enzimas na forma solúvel, principalmente a dificuldade de recuperá-las ao final do processo. Como as enzimas são catalisadores, em geral, caros, e de difícil produção em estado puro, torna-se economicamente conveniente reutilizá-las. Dessa forma, diferentes técnicas de imobilização enzimática vêm sendo

desenvolvidas, objetivando garantir a recuperação das enzimas ao final de cada processo e também aumentar a estabilidade enzimática (Villeneuve *et al.*, 2000). No entanto, vale destacar que, para empregar um determinado material como suporte para imobilização enzimática, este deverá apresentar algumas características básicas, como ser insolúvel em meio aquoso; ser estável mecanicamente; apresentar porosidade adequada; interagir com a enzima de forma a evitar sua dessorção, mas sem inativá-la; apresentar baixo custo de produção (Freire, 1996).

A técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas tem recebido, então, especial destaque. A partir deste processo de polimerização é possível sintetizar partículas com morfologia casca-núcleo porosas, com área específica expressiva, apresentando grupamentos funcionais na casca sem haver a necessidade de etapas adicionais de funcionalização. Essa técnica engloba uma etapa inicial (a polimerização em suspensão), na qual ocorre a formação do núcleo polimérico. No momento em que a reação atinge uma determinada conversão, novos constituintes são alimentados ao reator, iniciando-se a etapa de polimerização em emulsão. Os processos em emulsão e suspensão são, então, conduzidos simultaneamente. Por apresentar um caráter pegajoso, o núcleo captura as partículas geradas na polimerização em emulsão, havendo a formação da casca polimérica (Lenzi *et al.*, 2003).

Nesse contexto, o presente trabalho visou à produção de diferentes biocatalisadores com potencial aplicação na síntese de biodiesel e na resolução de misturas racêmicas. Para isso, inicialmente, diferentes reações de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas foram realizadas. Os núcleos foram produzidos a partir da polimerização em suspensão do estireno. Em seguida, os componentes da emulsão foram alimentados, havendo a formação da casca polimérica. Nesta etapa da reação, diferentes comônômeros foram copolimerizados com estireno, gerando diferentes partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, apresentando diferentes graus de hidrofobicidade na casca. Em uma etapa subsequente, tais partículas foram empregadas como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). O comportamento cinético de cada uma das imobilizações realizadas e as atividades de hidrólise e de esterificação de cada um dos biocatalisadores produzidos (enzima já imobilizada no suporte) foram avaliados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Todos os reagentes foram empregados sem nenhuma etapa de purificação. A Lipozyme® CALB L, lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), na forma solúvel, foi fornecida pela empresa Novozymes. O substrato utilizado para a determinação das atividades de hidrólise foi o *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL), fornecido pela Fluka, com pureza mínima de 98% p/p. O etanol PA, fornecido pela Vetec Química Fina, com uma pureza mínima de 99,8% p/p, foi utilizado para a lavagem dos suportes poliméricos e também como substrato nas reações de esterificação. O ácido oleico foi fornecido pela Vetec Química Fina (com pureza mínima de 98% p/p) e foi usado como substrato nas reações de esterificação. Os monômeros empregados nas reações de polimerização foram: estireno, fornecido pela Sigma Aldrich, com pureza mínima de 99,5% p/p; divinilbenzeno (DVB), fornecido pela Merck com pureza mínima de 99% p/p; 1-octeno, fornecido pela Merck, com pureza mínima de 97% p/p;

benzoato de vinila, fornecido pela Sigma Aldrich, com pureza mínima de 99% p/p; cardanol, fornecido pela Resibrás, com pureza mínima de 95,4% p/p. Outros reagentes e solventes utilizados na purificação e caracterização das partículas poliméricas e dos biocatalisadores eram de grau analítico.

## **2.2. Preparação dos suportes**

Os suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo foram sintetizados a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, como descrito em alguns trabalhos da literatura (Lenzi *et al.*, 2003; Besteti, 2009; Pinto, 2013; Cunha *et al.*, 2014). As reações foram realizadas em reator de vidro de 1 L encamisado, acoplado a um banho termostático, usado para manter a temperatura da camisa a 85 °C. Para a síntese do núcleo, na etapa de suspensão, foi empregado apenas o estireno como monômero. No entanto, visando à alteração do grau de hidrofobicidade da casca, diferentes monômeros foram empregados na etapa de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas (estireno, divinilbenzeno, cardanol, benzoato de vinila e 1-octeno). A partir destas reações, foram obtidos suportes com morfologia (casca/núcleo) com núcleo de poliestireno (PS) e diferentes composições na casca: poliestireno (PS), poli(estireno-co-benzoato de vinila) (PS-co-PBV), poli(estireno-co-octeno) (PS-co-PO), poli(estireno-co-cardanol) (PS-co-PC) e poli(estireno-co-divinilbenzeno) (PS-co-PDVB). A composição dos comonômeros adicionados à casca foi de 5% p/p em relação à carga monomérica total da casca. Após o término das reações, as partículas foram filtradas, lavadas e secas.

## **2.3. Caracterização dos suportes**

As partículas poliméricas casca-núcleo foram caracterizadas quanto a sua morfologia, por meio de estudos de microscopia eletrônica por varredura (MEV), usando um microscópio Fei Company, modelo Quanta 2000. As partículas passaram por um processo prévio de metalização. Para caracterizar a área específica, o diâmetro médio de poros e o volume específico de poros dos suportes produzidos, foi utilizado o equipamento ASAP 2020, fornecido pela Micrometrics, usando-se nitrogênio como gás adsorvente (fisissorção) e empregando-se o modelo BET e o método BJH. A determinação do ângulo de contato, importante para diferenciar o grau de polaridade das partículas produzidas, foi realizada em um tensiômetro Kruss Process, modelo K100, utilizando a água como meio de referência.

## **2.4. Imobilização enzimática**

Os procedimentos de imobilização enzimática e de dosagem das atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores (enzimas já imobilizadas) são descritos em diferentes estudos da literatura (Cunha, 2011; Pinto, 2013; Cunha *et al.*, 2014). Conforme os estudos apresentados, a primeira etapa do processo de imobilização consistiu na lavagem dos suportes, buscando-se diminuir o grau de hidrofobicidade dos mesmos e facilitar a penetração da solução enzimática para seu interior. Dessa forma, 1g de cada suporte foi colocado em contato com 10ml de etanol por um período de 30min. Em seguida, os suportes foram filtrados e lavados com água destilada até completa remoção de etanol. Por fim, os suportes foram lavados com uma solução de fosfato de sódio (5mM, pH 7), filtrados e armazenados na geladeira.

Após a lavagem, a1g de cada suporte foram adicionados 10 ml da solução enzimática diluída, com atividade inicial de 100 U/g<sub>suporte</sub>. A imobilização enzimática ocorreu por um período de 25 h, com uma velocidade de agitação de 250 rpm a 4 °C. A cinética de imobilização foi acompanhada por meio da dosagem da atividade hidrolítica da enzima ainda presente na fase solúvel ao longo da imobilização, empregando-se o *p*-nitrofenil laurato, como substrato (Cunha, 2011; Pinto, 2013; Cunha *et al.*, 2014).

## **2.5. Atividade hidrolítica**

Após a imobilização, os biocatalisadores (enzima já imobilizada) foram avaliados quanto à capacidade de catalisar reações de hidrólise. A atividade de hidrólise da enzima imobilizada foi determinada por método espectrofotométrico a 30 °C (comprimento de onda de 412 nm), usando *p*-nitrofenil laurato como substrato. A reação era iniciada pela adição do biocatalisador a um meio contendo a solução de substrato e tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7). Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio (Cunha, 2011; Pinto, 2013; Cunha *et al.*, 2014). As reações de hidrólise foram realizadas em triplicata e o erro experimental foi calculado com grau de confiança de 95%.

## **2.6. Atividade de esterificação**

Os biocatalisadores também foram avaliados quanto à capacidade de catalisar reações de esterificação. Para tal, 0,2 g de biocatalisador foram adicionados a um reator encamisado contendo uma mistura de 10,1 ml de ácido oleico e 1,9 ml de etanol (substratos das reações de esterificação). As reações foram realizadas a 40 °C e a 250 rpm. Ao longo da reação, alíquotas de 100 μl do meio reacional foram recolhidas e tituladas com uma solução de NaOH 0,02M, a fim de determinar a concentração de ácido oleico ainda presente no meio reacional. Uma unidade de atividade da lipase (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de oleato de etila por minuto nas condições reacionais utilizadas (Cunha, 2011; Pinto, 2013; Cunha *et al.*, 2014). Algumas reações foram realizadas em triplicata e o erro experimental foi calculado com grau de confiança de 95%.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como mencionado anteriormente, para avaliar a influência da composição da casca polimérica dos suportes casca-núcleo na imobilização CAL-B, foram produzidas partículas com diferentes composições e polaridades na casca. A partir das análises das micrografias, apresentadas na Figura 1, é possível observar que os suportes possuem estrutura casca-núcleo e um aspecto floculento, resultado da deposição das partículas geradas na etapa da polimerização em emulsão sobre os núcleos de PS. Além disso, é possível perceber que em algumas partículas o recobrimento do núcleo foi menos uniforme, como é o caso das partículas com casca de PS-co-PC.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de diâmetro médio de poro e área específica das partículas produzidas. Nota-se que os valores de diâmetro médio de poro dos suportes sintetizados

estão na faixa de 217,8 a 378,0 Å. Ou seja, não há nenhum impedimento espacial para o acesso da CAL-B ao interior dos poros dos suportes, uma vez que esta possui dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å (Uppenberg *et al.*, 1994). Observa-se também a existência de uma relação inversa entre área específica e diâmetro médio de poro, indicando que ocorre a aglomeração das partículas geradas na fase da emulsão sobre os núcleos de PS (gerados na fase da polimerização em suspensão). Percebe-se também que, apesar da pequena alteração na composição da casca, partículas com diferentes graus de hidrofobicidade foram produzidas, uma vez que os ângulos de contato obtidos variaram na faixa de 71,3 a 91,8°.

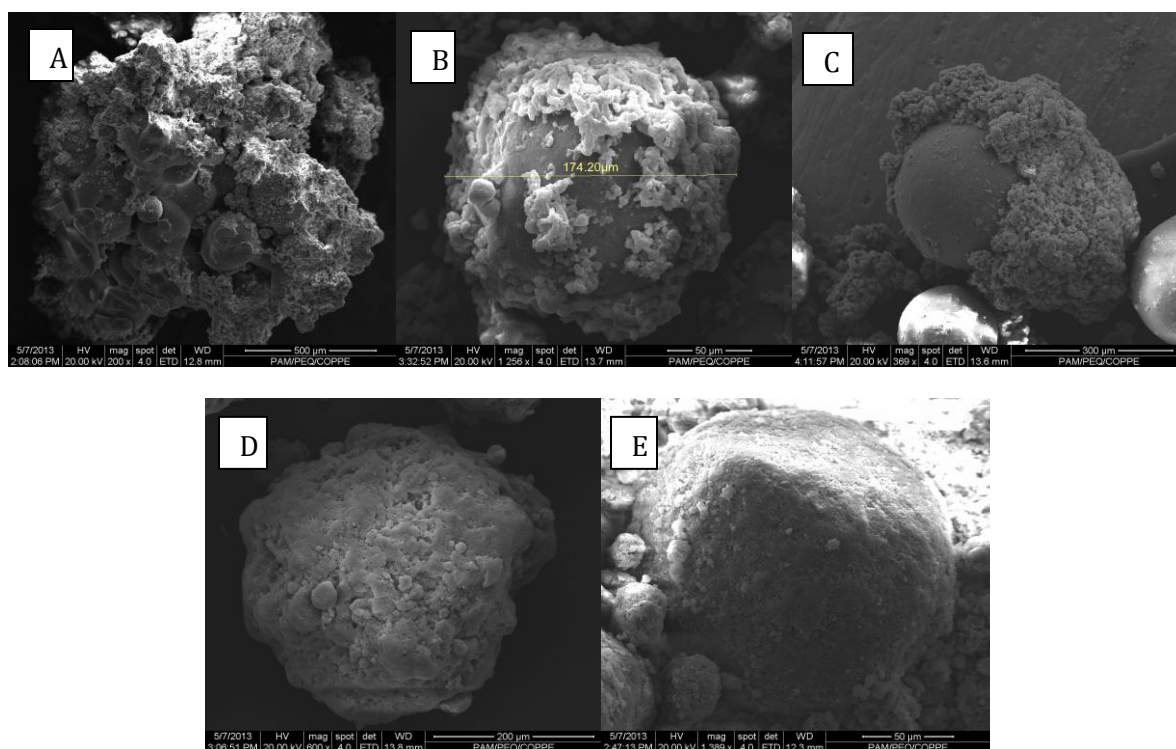


Figura 1 – A) PS/PS; B) PS-co-PBV/PS; C) PS-co-PC/PS; D) PS-co-PO/PS; E) PS-co-PDVB/PS.

Na Figura 2 são mostrados os perfis cinéticos das imobilizações enzimáticas nos diferentes suportes produzidos. É possível observar que o suporte com casca de PS-co-PO apresentou maior velocidade de adsorção da lipase nos instantes iniciais do processo de imobilização. Nota-se também que quando o suporte de PS-co-PBV/PS foi empregado, uma maior quantidade de enzima foi adsorvida (menor quantidade de enzima presente no sobrenadante), seguido pelos suportes de PS-co-PC/PS e PS-co-PO/PS. Esses resultados mostram que, dentre outros fatores, a existência de grupamentos polares na casca dos suportes facilita a imobilização da CAL-B, uma vez que a imobilização é realizada em meio polar, havendo maior facilidade do meio enzimático difundir para o interior dos poros.



Tabela 1 – Características superficiais dos suportes produzidos.

Suporte casca-núcleo	Área específica (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro médio de poro (Å)	Ângulo de contato (°)
PS-co-PDVB/PS	18,3	217,8	84,0 ± 1,7
PS-co-PO/PS	5,6	292,6	71,9 ± 0,9
PS-co-PC/PS	3,2	264,8	78,4 ± 1,7
PS/PS	1,6	357,5	91,8 ± 0,7
PS-co-PBV/PS	1,2	378,0	71,3 ± 2,3

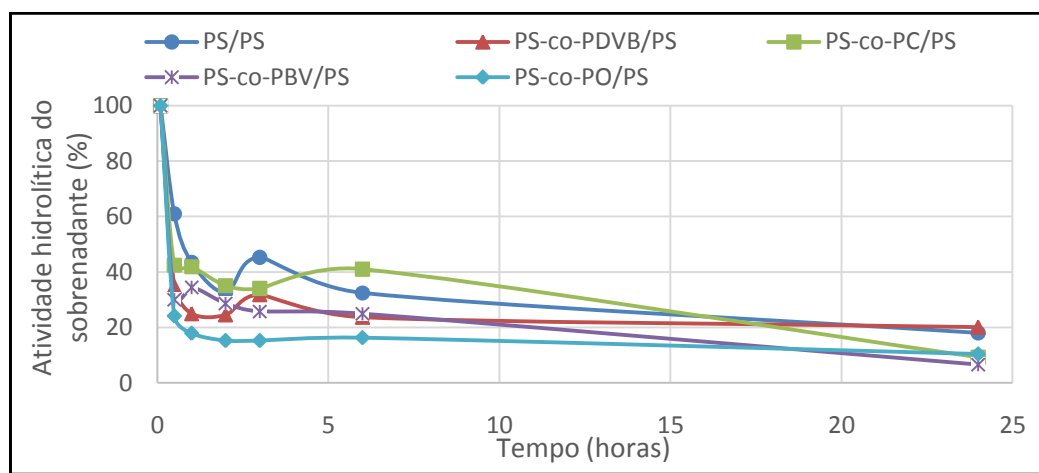


Figura 2 – Perfil cinético da imobilização da CAL-B nos diferentes suportes produzidos.

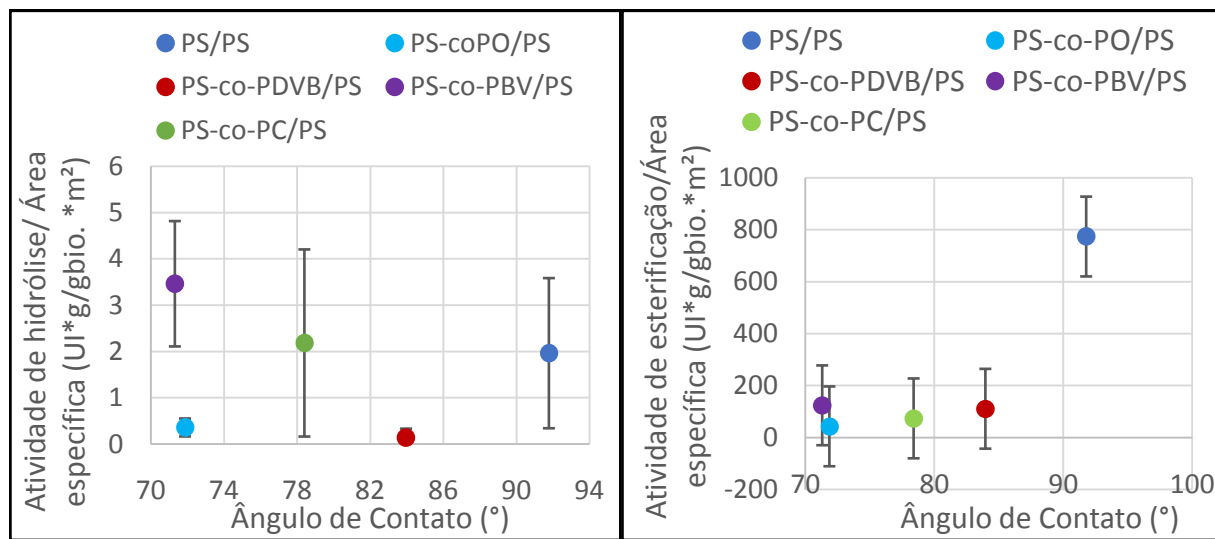
A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, nota-se que os biocatalisadores apresentam uma baixa atividade hidrolítica, quando comparadas às atividades de esterificação, confirmando resultados obtidos em estudos anteriores para suportes de PS/PS (Pinto, 2013). A baixa atividade hidrolítica é resultado das características da própria CAL-B, que é comumente empregada para catalisar reações de esterificação. Na Figura 3 é apresentada a influência do grau de hidrofobicidade dos suportes no desempenho dos biocatalisadores.

Ao observar a Figura 3-A), nota-se que quando suportes com maior carácter hidrofóbico são empregados, há uma tendência de aumento da atividade de hidrólise do biocatalisador; muito provavelmente, em função da maior exposição do centro ativo da CAL-B (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). No entanto, o mesmo comportamento é observado quando há o aumento do grau de hidrofiliicidade dos suportes para valores mais expressivos. Nesse caso, é possível que a difusão do substrato para o interior do suporte seja facilitada, havendo um consequente aumento de atividade

enzimática. Ao analisar a atividade de esterificação, Figura 3-B), o aumento do grau de hidrofobicidade provoca um aumento da atividade do biocatalisador. Nos biocatalisadores mais hidrofóbicos, o centro ativo da CAL-B está, provavelmente, mais exposto, o que justifica as maiores atividades encontradas. Além disso, nas reações de esterificação, ao contrário das reações de hidrólise, a água não atua como um reagente e sim como um inibidor competitivo. Assim, os biocatalisadores mais hidrofóbicos possivelmente mantêm a água mais afastada do sítio ativo, havendo um aumento da atividade de esterificação (condições aquo-restritas) (Freire, 1996).

Tabela 2 – Atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores produzidos.

Suporte casca-núcleo	Atividade de hidrólise do biocatalisador (UI/g <sub>bio</sub> )	Atividade de esterificação do biocatalisador (UI/g <sub>bio</sub> )
PS-co-PDVB/PS	2,5±0,2	2030,5± 153,7
PS-co-PO/PS	2,0±0,2	240,0 ± 153,7
PS-co-PC/PS	7,0±2,0	237,8± 153,7
PS/PS	3,2±1,6	1258,0 ± 153,7
PS-co-PBV/PS	4,1±2,7	147,7± 153,7



(A)

(B)

Figura 3—Influência do grau de hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo na atividade dos biocatalisadores: A) atividade de hidrólise; B) atividade de esterificação.

## 4. CONCLUSÃO

Por tudo que foi apresentado, pôde-se observar que pequenas mudanças na composição da casca das partículas casca-núcleo provocam modificações expressivas na sua morfologia (área específica, diâmetro médio de poro) e grau de hidrofobicidade. Tais características morfológicas, por

sua vez, afetam o comportamento cinético ao longo da imobilização. Foi possível notar também que o desempenho dos biocatalisadores produzidos depende não só da morfologia dos suportes empregados na imobilização da enzima, mas também da composição do meio reacional onde é empregado. Ao considerar as reações de hidrólise, aparentemente há uma região de mínima atividade do biocatalisador. No entanto, ao analisar as atividades de esterificação, o aumento do grau de hidrofobicidade dos suportes é acompanhado pelo aumento da atividade do biocatalisador correspondente. Os comportamentos observados resultam de dois efeitos antagônicos que afetam o desempenho do biocatalisador: maior exposição do sítio ativo das enzimas (suportes hidrofóbicos) ou menor (suportes hidrofílicos); presença mais significativa de limitações difusionais (reações de hidrólise) ou menos expressiva (reações de esterificação).

## 5. REFERÊNCIAS

- BESTETI, M. D. Produção e caracterização de partículas casca-núcleo obtidas pela polimerização simultânea em suspensão e emulsão. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PEQ-COPPE, Rio de Janeiro, 2009.
- CASTRO, H. F., ZANIN, G. M., MORAES, F. F., SÁ-PEREIRA, P. *Imobilização de Enzimas e sua Estabilização*. Em: Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L. (eds). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado*, 1ª ed., capítulo 06, Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.
- CUNHA, A. G. Resolução cinética de derivados de mio-inositol catalisada por lipases. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2011.
- CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; DA SILVA, A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer support to immobilize lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 100, p. 59-67, 2014.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 93, p. 185-197, 1998.
- FREIRE, D. M. Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.
- LENZI, M. K., SILVA, F. M., LIMA, E. L., PINTO, J. C. Semibatch Styrene Suspension Polymerization Processes. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 89, p. 3021-3038, 2003.
- PINTO, M. C. C. Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PEQ-COPPE, Rio de Janeiro, 2013.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, p. 293-308, 1994.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J. Customizing lipases for biocatalysis A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 9, p. 113-148, 2000.



## ANEXO

Todas as referências solicitadas pelos revisores foram adicionadas ao corpo do texto e na seção Referências, incluindo as referências solicitadas, correspondentes à metodologia experimental de dosagem da atividade de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores.

As referências utilizadas para determinação da metodologia experimental de dosagem da atividade de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores foram:

CUNHA, A. G. Resolução cinética de derivados de mio-inositol catalisada por lipases. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2011.

CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; DA SILVA, A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer support to immobilize lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 100, p. 59-67, 2014.

PINTO, M. C. C. Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PEQ-COPPE, Rio de Janeiro, 2013.