

# IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SBA-15 POR ADSORÇÃO E LIGAÇÃO COVALENTE: ESTUDO COMPARATIVO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO AZEITE DE OLIVA

S. M. P. MARCUCCI<sup>1</sup>, E. R. ZANATTA<sup>2</sup>, L. S. da SILVA<sup>1</sup>, R. Z. RAIA<sup>1</sup>, G. M. ZANIN<sup>1</sup>, P. A. ARROYO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Núcleo de Alimentos

silviomarcucci@gmail.com

**RESUMO** – A peneira molecular SBA-15 foi sintetizada e caracterizada por análises de Adsorção/Dessorção de Nitrogênio e Difração de Raios X. A amostra de SBA-15 obtida foi empregada como suporte para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* por simples adsorção e ligação covalente. A reação de hidrólise do azeite de oliva foi utilizada com o objetivo de comparar a recuperação da atividade específica em relação à enzima livre e reuso do biocatalisador. Os testes demonstraram que o catalisador enzimático preparado por adsorção apresentou maior recuperação percentual de atividade específica (72,7% contra 50,67 %), porém menor estabilidade operacional (4 ciclos contra 5 até que a atividade atingisse 50% do valor da atividade original).

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que naturalmente atuam na hidrólise de óleos e gorduras, porém, em meios com quantidade baixa de água, são capazes de atuarem em outros tipos de reações como a esterificação, alcoólise, acidólise, aminólise, entre outras. As lipases geralmente são solúveis aos seus substratos e aos produtos reacionais (Barros *et al.*, 2010).

O uso de lipases solúveis implica na sua difícil remoção do produto e também dificulta o controle do processo. Com o objetivo de contornar estes problemas e ao mesmo tempo reduzir os custos operacionais, diversas técnicas de imobilização têm sido estudadas e aplicadas como, por exemplo, adsorção física e ligação covalente (Zhou e Hartmann, 2013).

A técnica de adsorção física consiste em uma fixar a enzima ao suporte por meio de interações fracas como forças de van der Waals, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, já a ligação covalente baseia-se na ligação química por troca de elétrons entre o suporte e a enzima. O método de imobilização utilizado é de grande importância para o desempenho do catalisador enzimático (Zhang *et al.*, 2013).

Além da técnica de imobilização, um fator de grande importância é o tipo de suporte utilizado. De acordo com Hudson *et al.* (2008), materiais mesoporosos ordenados apresentam-se como uma boa alternativa para imobilização de enzimas pois possuem alta área específica quando comparados aos materiais não porosos e também ajuste do tamanho de poros de modo que a enzima possa se inserir no interior desses materiais e não apenas na superfície externa como acontece com as zeólitas.

Um material mesoporoso que possui essas características é a peneira molecular SBA-15, a qual possui arranjo hexagonal regular de poros com estreita distribuição de tamanho (46 a 300 Å), espessura de parede de 31 a 64 Å e área específica maior que 600 m<sup>2</sup>/g (Zhao *et al.*, 1998).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Síntese e Caracterização da Peneira Molecular SBA-15.b**

O método utilizado para a síntese da SBA-15 foi baseado no trabalho desenvolvido por Zhao *et al.* (2000).

Misturou-se 4 g de Pluronic P123 (SIGMA), 120 g de solução de HCl (2 mol/L) e 30 g de água deionizada até a dissolução do polímero. Em seguida foram adicionados 8,5 g de Tetraetilortossilicato (TEOS, 98%, SIGMA). O sistema foi mantido sob agitação a 40 °C durante 24 horas. Posteriormente a mistura foi colocada em autoclaves de aço revestidas de Teflon e levada para estufa, onde passou por tratamento hidrotérmico a 100 °C por 24 horas. Após este período o material foi filtrado sob vácuo e lavado até que o pH da solução aquosa resultante da lavagem atingisse o valor de 7,0.

O sólido obtido foi seco em estufa a 100 °C por 15 horas e calcinado em forno mufla sob condições estáticas a 550 °C com rampa de aquecimento de 1 °C/min.

A caracterização foi baseada em Análises de Difração de Raios X por meio do uso de um Difractômetro Bruker D-8 Advanced, varredura de 2θ de 0,5 a 5° com step de 0,01° e velocidade de 2s/step, análises de Adsorção/Dessorção de Nitrogênio realizadas em um equipamento Micrometrics ASAP 2020 com tratamento das amostras a 300 °C sob vácuo por um período de 3 horas para a SBA-15 e 80 °C por 16 horas para a SBA-15 modificada.

### **2.2. Imobilização da Lipase.**

Modificação da SBA-15 para Imobilização por Ligação Covalente: A SBA-15 passou por um processo de silanização com o reagente γ-Aminopropiltrietoxissilano (γ-ATPS) solução 0,5% (v/v) seguido de funcionalização com Glutaraldeído 2,5% (v/v) conforme procedimento de Soares *et al.* (1999). Em um balão de fundo redondo foram colocados 1,5 g da SBA-15 juntamente com 13,5 mL da solução de γ-ATPS e o sistema foi levado a um rotavapor e mantido sob agitação rotativa (80 rpm) a 75 °C durante 3 horas. Em seguida o suporte silanizado foi lavado, filtrado a vácuo e seco em estufa por 15 horas a 105 °C. Após secagem o sólido foi transferido para um béquer e então a solução de Glutaraldeído foi adicionado até a sua imersão. A funcionalização foi feita por uma hora em banho a 25 °C sem agitação e então o suporte funcionalizado foi lavado, filtrado a vácuo e seco em dessecador

durante 24 horas (Soares *et al.*, 1999).

**Imobilização:** Preparou-se uma solução enzimática (Lipase de *Burkholderia cepacia*, SIGMA) tamponada (tampão fosfato pH 7,0) com concentração de 0,03 g/mL. A esta solução 1 g de SBA-15, sem modificação ou funcionalizada, foi adicionado e a mistura mantida sob agitação em banho termostatzado (25 °C) durante 2 horas permanecendo, posteriormente, sob condições estáticas a 4 °C durante 24 horas. Por fim, os biocatalisadores foram lavados com tampão pH 7,0, filtrado a vácuo e seco em dessecador por um período de 24 horas. Os biocatalisadores foram classificados em SBA/LC (Ligação Covalente, SBA-15 modificada) e SBA/ADS (Adsorção, SBA-15 sem modificação) (Soares *et al.*, 1999).

**Análise de Umidade:** A quantidade percentual de água nos biocatalisadores foi medida por meio de titulador automático Karl Fischer (Mettler DL18).

## 2.4. Análise de Proteína

As concentrações de proteína foram analisadas pelo método de Bradford (1976).

### 2.5b. Atividade e Reuso

A hidrólise do Azeite de Oliva baseado no trabalho desenvolvido por Soares *et al.* (1999) foi escolhido para determinar a atividade específica conforme descrito a seguir.

Uma emulsão contendo 50 mL de solução 7 % (m/v) de Goma Arábica e 50 mL de Azeite de Oliva foi preparada. Esta solução foi mantida em banho a 37 °C. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 0,1 g de biocatalisador imobilizado ou 1 mL de solução enzimática (0,03 g/mL) juntamente com 2 mL de Tampão Fosfato pH 7,0. Após cinco minutos de incubação, 5 mL da emulsão foram adicionados. A reação prosseguiu por 10 minutos a 37 °C. Os ácidos graxos formados foram analisados por titulação com KOH 0,02 N sendo a fenoltaleína. Preparou-se um controle nas mesmas condições da reação para o biocatalisador imobilizado e enzima livre, porém, 1 mL de água foi adicionado ao meio reacional. As reações foram feitas em triplicata.

Para o reuso, após a reação, lavou-se o biocatalisador com Tampão e o mesmo foi seco a vácuo por 10 minutos e utilizado em uma nova batelada.

A equação (1) foi empregada para o cálculo da atividade e a (2) para a recuperação de atividade.

$$U(\text{mmol min}^{-1})/\text{mg} = \frac{(V_A - V_B) \cdot 10^3 \cdot N}{t \cdot m} \quad (1)$$

Em que:

$V_A$  é Volume de KOH gasto na titulação da reação com biocatalisador imobilizado ou enzima livre,  $V_B$  o Volume de KOH gasto na titulação do controle,  $N$  representa a normalidade da solução de KOH,  $t$  o tempo da reação e  $m$  a massa de proteína.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{U/\text{mg (biocatalisador imobilizado)}}{U/\text{mg (enzima livre)}} * 100 \quad (2)$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

#### 3.1. Síntese e Caracterização da SBA-15

Difração de Raio X: A figura 1 representa o difratograma da amostra de SBA-15 sintetizada e calcinada.

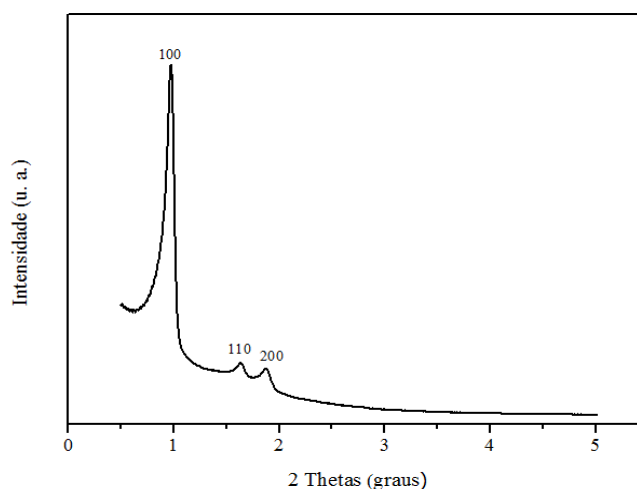


Figura 1 – Difratograma da SBA-15 calcinada.

O difratograma da Figura – 1 apresentou três picos que são característicos de um material mesoporoso com arranjo hexagonal de poros. A amostra não apresentou os picos (300), (220) e (310) conforme descrito no trabalho de Zhao *et al* (1998) indicando que a mesma teve um menor grau de organização que o material sintetizado no artigo citado.

Adsorção/Dessorção de Nitrogênio: A figura – 2 ilustra as curvas de adsorção/dessorção resultantes das análises da SBA-15 calcinada e da SBA-15 modificada após o pré-tratamento (SBA-15 mod.).

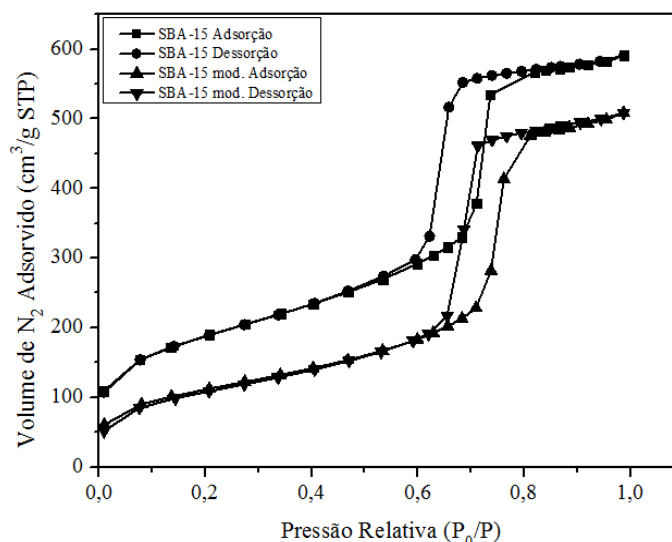


Figura 2 – Curvas de Adsorção/Dessorção de N<sub>2</sub>

Trata-se de isotermas do tipo IV atribuída a materiais mesoporosos. A histerese é do tipo H1 que representa características de materiais com estreita faixa de distribuição de poros (Sing *et al.* 1985).

Mesmo após o tratamento as isotermas seguiram o padrão de mesoporos com estreita faixa de distribuição de tamanho de poros, porém, com diminuição da quantidade de N<sub>2</sub> adsorvido indicando que houve a incorporação dos reagentes utilizados na modificação.

Os parâmetros texturais das amostras estão representados na Tabela – 1.

Tabela 1 – Propriedades Texturais da SBA-15

Amostra	BET Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poros (nm)	Volume de Poros (m <sup>3</sup> /g)
SBA-15	828	7,0	1,02
SBA-15 mod.	394,5	6,85	0,74

Após a modificação houve uma ligeira diminuição no diâmetro de poros e uma diminuição maior na área específica e no volume de poros. Isso reforça a hipótese antes mencionada da incorporação dos reagentes utilizados na modificação da SBA-15.

### 3.1 Análises de Proteína

Os resultados para as análises de proteínas estão descritos na tabela abaixo.

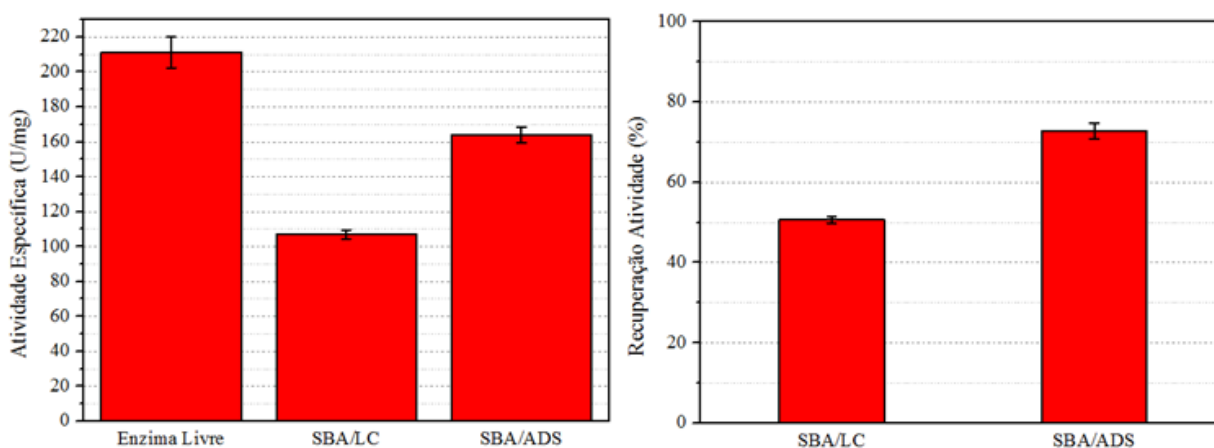
Tabela 2 – Análise de Proteína

Biocatalisador	Proteína Oferecida (PO) (mg)	Proteína no Filtrado (PF) (mg)	Proteína Fixada (PO-PF) (mg)	Recuperação (%)
SBA-15	1,22	-	-	-
SBA/LC	-	0,42	0,8	66
SBA/ADS	-	0,29	0,93	76

Conforme apresentado na Tabela 2 a recuperação da proteína foi maior para o biocatalisador SBA/ADS. A diminuição da área específica e do volume de poros podem ter sido um dos fatores relacionados à menor retenção de proteínas no catalisador enzimático SBA/LC.

### 3.1. Atividade

As atividades específicas da enzima livre e dos biocatalisadores imobilizados bem como a recuperação percentual da atividade dos biocatalisadores imobilizados em relação à enzima livre estão demonstradas na Figura – 3.



FFigura 3 – (a) Atividade total U (mmol min<sup>-1</sup>) e (b) Recuperação Atividade (%).

O biocatalisador SBA/ADS (72,7 contra 50,67 %). apresentou maior valor de recuperação de atividade. Mesmo tendo retido maior quantidade de proteína, o biocatalisador SBA/ADS demonstrou relação entre retenção de proteína/atividade maior pois com 75% de retenção de proteína proporcionou recuperação de atividade de 72,7% enquanto que o catalisador enzimático SBA/LC reteve 66% de proteína e disponibilizou recuperação de atividade de 50,67%.

A ligação covalente entre a enzima e o suporte provoca mudanças conformacionais mais drásticas podendo afetar a sua estrutura tridimensional ativa enquanto que as forças envolvidas na adsorção são mais brandas e não geram grandes modificações na conformação enzimática (Zhao *et al.*, 2013).

### 3.1. Reuso

A Figura – 4 mostra o comportamento dos biocatalisadores quanto à atividade residual após seis ciclos operacionais.

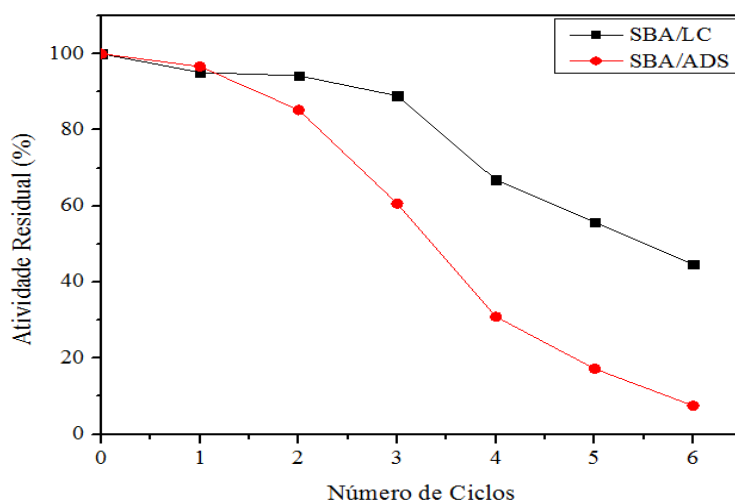


Figura 4 – Atividade Residual (%) em diferentes ciclos operacionais

A Figura – 4 demonstra que o biocatalisador SBA/LC apresentou melhor estabilidade operacional durante sucessivas reutilizações. No quarto ciclo o catalisador enzimático SBA/ADS já apresentou de atividade residual menor que 50 % original. Já o SBA/LC teve sua atividade residual abaixo de 50% somente na sexta reutilização.

De acordo com Murty *et al.* (2002), o processo de imobilização conduzido por adsorção, devido à fraca interação entre suporte e enzima, pode ocorrer a lixiviação da mesma. Já a imobilização por ligação covalente gera um biocatalisador mais estável.

## 4. CONCLUSÕES

O método utilizado para a síntese da SBA-15 resultou na estrutura característica dessa peneira molecular de acordo com as análises de Difração de Raio X e Adsorção/Dessorção de N<sub>2</sub> e o tratamento acarretou em alterações das características texturais da mesma, o que pode ter levado a uma menor quantidade de lipases retidas neste suporte.

Os dois biocatalisadores apresentaram características diferentes frente à reação de hidrólise do azeite de oliva. De acordo com os resultados o biocatalisador preparado a partir da técnica de adsorção demonstrou-se melhor do ponto de vista da recuperação da atividade em relação à enzima livre enquanto que o catalisador enzimático gerado pelo método da ligação covalente manteve-se mais estável nos testes de reuso.

## 6. REFERÊNCIAS

- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A.. Seed Lipases: Sources Applications and Properties – A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27, p. 15-29, 2010.
- 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, p. 248-254, 1976.
- MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K.. Hydrolisys of Oils Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, v. 7, p. 57-56, 202.
- SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUÉROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T.. Reporting Physorption Data for Gas/Solid Systems. *Pure & Appl. Chem.*, v. 57, p. 603 – 619, 1985.
- SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 77-79, p. 745-757, 1999.
- ZHANG, D. H.; YUWEN, L. X.; PENG, L. J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCK, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. v. 279, p. 548-552, 1998.
- ZHAO, D.; SUN, J.; LI, Q.; STUCKY, G. D.. Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15. *Chem. Mater.* v. 12, p. 275-279, 2000.
- ZHUO, Z.; HARTMANN, M.. Progress in Enzyme Immobilization in Ordered Mesoporous Materials and Related Applications. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, 3894-3912.