

APLICAÇÃO DA LIPASE *Candida antarctica* B IMOBILIZADA EM PHBV E PU NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE SÍNTESE

N. L. D. NYARI¹, I. A. FERNANDES¹, JAMILE ZENI¹, A. M. MOREIRA¹, D. OLIVEIRA², J. V. OLIVEIRA², E. RIGO³

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões- Departamento de Engenharia de Alimentos

²Universidade Federal de Santa Catarina- Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

³Universidade do Estado de Santa Catarina- Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail: nadialigianara@hotmail.com

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da lipase imobilizada em PHBV e PU na catálise de reações para síntese enzimática dos ésteres geranil oleato, geranil propionato e oleato de etila. A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozymes NZL-102, CAL B), adquirida na forma líquida da empresa Novozymes Latin América Ltda. A enzima CalB foi imobilizada em nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e espuma de poliuretano (PU). A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geraniol oleato apresentou 88,0 e 87,7% de rendimento, para o PHBV e PU, respectivamente. Para a síntese de oleato de etila, a CalB imobilizada em PHBV e PU apresentou 17,4 e 19,3% de rendimento, respectivamente. Na síntese de geranil propionato ambas as enzimas imobilizadas não apresentaram rendimento. Em termos de aplicação da lipase CalB imobilizada em nanopartículas de PHBV e espuma de poliuretano ambas apresentaram conversão para síntese de geranil oleato e oleato de etila.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação das lipases como biocatalisadores em processos industriais tem ocorrido em indústrias alimentícias, têxtil, de papel; e celulose, detergentes, óleos e gorduras, etc. Assim, esta classe de enzimas vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais com novas aplicações biotecnológicas estabelecidas com sucesso na síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de compostos farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e sabores (flavour) (Dalla Vecchia *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006; Kapoor e Gupta, 2012).

De acordo com Castilho (2001) é de suma importância a escolha da enzima “ideal” que será utilizada no processo após a investigação sobre os fatores que influenciam sua aplicação em processos industriais. Esta definição repercute na necessidade de estudos quanto ao uso de lipases principalmente em aplicações industriais de larga escala, devido suas características peculiares, pois são biocatalisadores acessíveis, ou seja, de fácil produção, baixo custo de geração, não requerimento de cofatores, operação em condições brandas de temperatura e pH, minimização de problemas de isomerização, racemização e rearranjo e estabilidade à solventes orgânicos.

Assim as lipases, fazem parte de um grupo de enzimas onde o interesse comercial tem aumentado, em função da possibilidade de reverter sua forma de atuação em meio orgânico, de tal forma que reações de esterificação e interesterificação possam ser conduzidas. Tais reações são de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos ampliando, simultaneamente, o potencial de aplicação das enzimas em processos (Castro *et al.*, 2004; Aravindan *et al.*, 2007; Idris e Bukhari, 2012).

Portanto, a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, possibilitando produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições do uso das enzimas em processos industriais (Zanin *et al.*, 2004). A escolha de um biocatalisador imobilizado está relacionada com a possibilidade de aplicação, atividade catalítica, viabilidade de operação contínua do processo, maior facilidade de controle e de separação do produto final, além do aumento de estabilidade ao meio reacional, pH e à temperatura, entre outros (Mendes *et al.*, 2011).

Neste contexto, muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em nanopartículas de PHBV e espuma de PU na catálise de reações para síntese enzimática dos ésteres geranil oleato, geranil propionato e oleato de etila.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metodologia

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozymes NZL-102, CalB), adquirida na forma líquida da empresa Novozymes Latin América Ltda. A enzima CalB foi imobilizada em nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e espuma de poliuretano (PU).

Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato): o polímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (M_w) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85 foi gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A. O polímero foi submetido a uma pré-purificação, pela sua dissolução em clorofórmio e posterior precipitação em n-heptano para retirada de impurezas.

Poliuretano: Os monômeros comerciais poliálcool e isocianato, utilizados nesse trabalho foram produzidos com uma formulação específica para colchões e espumas injetadas pela Empresa Flexível Poliuretanos - Mannes. O PU formado com os referidos monômeros resulta no PU do tipo flexível.

2.2. Imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte

Precipitação do polímero PHBV para formação de nanopartículas: A precipitação do poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) purificado foi realizada utilizando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente e diclorometano como solvente orgânico utilizando a técnica de Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) para formação das nanopartículas, utilizando a metodologia descrita por Franceschi (2009) e Fernandes (2013). O polímero PHBV foi adicionado a 40 mL de diclorometano.

Dentre os parâmetros investigados, foram mantidos constante a concentração de PHBV (30 mg.mL⁻¹), pressão da solução orgânica (80 bar), a taxa de fluxo da solução de 1 mL.min⁻¹, taxa de fluxo antissolvente de 40 mL.min⁻¹ e temperatura de 40 °C, com capilar de 100 µm, com base no trabalho de Franceschi (2009).

Processo de imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte: Em tubos de centrífuga de 50 mL, foram adicionados 0,1 g de nanopartículas de PHBV e 10 mL de solução enzimática da lipase CalB. Os tubos foram mantidos sob agitação suave de 7 rpm (Silva *et al.*, 2012) em agitador rotatório. Os parâmetros de imobilização, tempo de contato da enzima com as partículas de PHBV e o pH da solução enzimática, foram avaliados, buscando verificar a influência destes parâmetros no processo de imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte. O tempo de imobilização foi avaliado em 30, 60, 90, 120 e 150 min, em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, segundo metodologia proposta por Rodrigues *et al.* (2008).

A avaliação do efeito do pH na imobilização da enzima foi realizada utilizando-se o melhor tempo de imobilização (120 min) em diferentes tampões, na concentração de 25 mM, seguindo a faixa de pH estipulada para cada solução tampão, ou seja, acetato de sódio para pH 5; fosfato de sódio para os pHs 6, 7 e 8; tris aminometano para pH 9 e carbonato de sódio para pH 10. Posteriormente, separou-se o suporte PHBV impregnado da enzima (imobilizado) da solução enzimática (sobrenadante) por filtração a vácuo, realizando-se lavagem com água destilada sob filtro do aparato conectado a bomba a vácuo. Após, o imobilizado foi mantido durante 24 horas em dessecador para equalização do teor de umidade.

2.3. Imobilização da lipase CalB utilizando poliuretano como suporte

Polimerização de monômeros: A reação de polimerização do poliuretano foi realizada variando a razão molar dos monômeros poliol:isocianato (5:2, 5:3, 5:4, 5:5 e 3:5 (v/v)), com base no trabalho realizado por Silva *et al.* (2013) modificado. A reação de polimerização foi conduzida com auxílio de uma seringa graduada pela qual os monômeros foram misturados e, posteriormente, homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, durante 30 segundos. Após esta etapa ocorreu o estágio de polimerização (5 min) do poliuretano, expansão da espuma e completa solidificação (Silva *et al.*, 2013, modificado).

Processo de imobilização da CalB utilizando PU como suporte: A imobilização foi conduzida adicionando 10% do volume de *Candida antarctica* B diluída, aos monômeros. Para a imobilização, a enzima foi homogeneizada no monômero poliol e após, ao isocianato, sendo o recipiente mantenedor da mistura envolto em banho de gelo, buscando evitar o aumento excessivo da temperatura devido à reação exotérmica gerada pela mistura dos

monômeros. Após a etapa de polimerização, o poliuretano contendo a enzima (imobilizado) foi mantido durante 24 horas em dessecador para equalização do teor de umidade.

2.4. Avaliação da aplicação de lipases na catálise de reações de interesse

Esterificação enzimática de geraniol e ácido oleico: A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul *et al.*, 2011), onde misturou-se álcool geraniol e ácido oleico na proporção molar de 3:1. Os substratos foram adicionados em Erlemeyers de 50 mL com volume médio reacional de 5 mL. Foram adicionados ao meio reacional 10 esferas de peneira molecular. Pesou-se 0,5 g (10% (p/p)) em relação aos substratos) da enzima CalB imobilizada em PHBV e PU, onde o tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital com agitação constante de 160 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término do tempo de reação que foi fixado em 6 horas, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. A quantificação da conversão em ésteres foi realizada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11. Posteriormente, foi efetuada a determinação do rendimento da síntese de geranil oleato.

Esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico: A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul *et al.*, 2010), onde misturou-se álcool geraniol e ácido propiônico na proporção molar de 3:1. Os substratos foram adicionados em Erlemeyers de 50 mL com volume médio reacional de 5 mL. Foram adicionados ao meio reacional 10 esferas de peneira molecular. Pesou-se 0,5 g (10% (p/p)) em relação aos substratos) da enzima CalB imobilizada em PHBV e PU, onde o tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital com agitação constante de 160 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término do tempo de reação que foi fixado em 6 horas, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. A quantificação da conversão em ésteres foi realizada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 9. Posteriormente, foi efetuada a determinação do rendimento da síntese de geranil propionato.

Esterificação enzimática de ácido oleico e etanol: A avaliação da capacidade de reação da CalB imobilizada em PHBV e PU na reação de síntese do oleato de etila foi realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar (1:1) descrita por Ferraz *et al.* (2012) modificado. A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionado cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) (Paroul, 2011). Posteriormente, foi efetuada a determinação do rendimento da síntese de oleato de etila.

Determinação do rendimento das reações de síntese: A determinação do rendimento foi realizada segundo Paroul (2011), conforme mostram as Equações 1, 2, 3 e 4:

$$Qa = v C \quad (1)$$

$$Ar = \frac{1 \text{ mol ácido } m}{MM} \quad (2)$$

$$Ma = \frac{Qa \, vt}{va} \quad (3)$$

$$R = 100 - \frac{Ma \cdot 100}{Ar} \quad (4)$$

Sendo:

A_r : ácido que reagiu (mol); C : concentração de NaOH (mol.L⁻¹); m : massa de ácido (g); M_a : mols de ácido oleico (mol); MM : massa molar (g.mol⁻¹); Q_a : quantidade de ácido (mol); R : rendimento de conversão (%); v : volume gasto de NaOH (L); v_t : volume total (mL); v_a : volume de amostra (mL).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da imobilização da CalB em PHBV

Considerando que a enzima CalB apresenta-se na forma líquida, a imobilização desta em nanopartículas de PHBV através do método de adsorção se torna uma alternativa viável. Portanto, o polímero PHBV purificado foi precipitado utilizando a técnica de alta pressão (conforme apresenta o item 2.2), para formação das nanopartículas.

O estudo do tempo de imobilização da lipase *Candida antarctica* B diluída em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 em nanopartículas de PHBV indicou o período de contato de 120 min, entre a enzima e o suporte necessário para que houvesse um bom fator de imobilização. Resultados similares foram obtidos por Brigida (2006), onde a atividade hidrolítica da CalB solúvel imobilizada em fibra de coco verde permaneceu inalterada após 120 min a pH 7.

Levando em consideração que o ponto isoelétrico da lipase CalB é o pH 6, os resultados obtidos neste estudo indicaram uma faixa de pH ótimo próxima do ponto isoelétrico da enzima (Uppenberg *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

3.2. Avaliação da imobilização da CalB em PU

A avaliação das condições de imobilização permitiu identificar que na razão 5:3 (v/v) de poliálcool/isocianato, ocorreu a formação de uma espuma mais flexível com poros uniformes e, portanto, esta foi a proporção empregada na avaliação da imobilização da CalB. A quantidade de enzima previamente diluída em tampão, 10% (v/v), foi previamente adicionada ao monômero poliálcool. Após uma etapa de mistura, fez-se a adição do isocianato, deixando polimerizar por 5 minutos. A espuma formada apresentou uma boa uniformidade na estrutura polimérica, o que indica que ocorreu imobilização da enzima.

3.3 Avaliação da aplicação da lipase CalB imobilizada na catálise de reações de síntese

A aplicação da lipase imobilizada em PHBV e PU na catálise de reações para síntese enzimática dos ésteres geraniol oleato, geraniol propionato e oleato de etila estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Conversões reacionais obtidas nas reações catalisadas pela CalB imobilizada em PHBV e PU na esterificação de geraniol com ácido oleico e propiônico e do ácido oleico e etanol.

	Conversão da Lipase CalB Imobilizada (%)	
	PHBV	PU
Geraniol oleato	88,0	87,7
Geraniol propionate	0	0
Oleato de etila	17,4	19,3

A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geraniol oleato apresentou 88,0 e 87,7% de rendimento, respectivamente. Resultado similar foi reportado por Paroul *et al.* (2011), onde foi utilizada a razão molar geraniol:ácido oleico 3:1 (v/v), a 40 °C, 160 rpm com 10% enzima imobilizada, obtendo um rendimento de 93,0 %. Para ambas as enzimas imobilizadas, a reação com geraniol e ácido propiônico não apresentou conversão. Para a síntese de oleato de etila, a CalB imobilizada em PHBV e PU apresentou 17,4 e 19,3 % de rendimento, respectivamente.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e alcoóis. Paroul (2011) otimizou a produção de geraniol propionato na condição de razão molar 3:1 (geraniol : ácido propiônico) e 10% de enzima Novozym 435, alcançando uma conversão média de 94,6% em produto.

4. CONCLUSÃO

Em termos de aplicação da lipase CalB imobilizada em nanopartículas de PHBV e espuma de poliuretano ambas apresentaram conversão para síntese de geraniol oleato e oleato de etila.

De um modo geral, a lipase CalB imobilizada em nanopartículas de PHBV e espuma de PU utilizada para a esterificação enzimática conduziram a conversões satisfatórias, indicando que um estudo mais detalhado deve ser realizado, buscando a otimização do processo, para os extratos que apresentam, neste sistema reacional, maior potencial de aplicação como biocatalisador.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 141-158, 2007.

BRIGIDA, A. I. S. Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte. Dissertação de Mestrado. Fortaleza-CE, 2006.

CASTILHO, L. R. Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells. VDI-Verlag, Alemanha, 97, 2001.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

DALLA VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

FERNANDES, I. A. Estudo da imobilização de lipases utilizando Poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e Poliuretano (PU) como suportes. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Erechim.

FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. dos S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 243-252, 2012.

FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de β - caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - Brasil, abril de 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microb. Technol.*, v. 39, p. 235-251, 2006.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 550–563, 2012.

KAPOOR, M., GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1-15, 2012.

LIU, Y.; JIA, S.; WU, Q.; RAN, J.; ZHANG, W.; WU, S. Studies of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles prepared by co-precipitation under the magnetic field for lipase immobilization. *Catalysis Communications*, v. 12, p. 717-720, 2011.

MARTÍNEZ, M.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T. Characterization of a new internal promoter (P3) for *Rhizobium leguminosarum* hydrogenase accessory genes hupGHIJ. *Microbiology*, v. 150 (3), p. 665-675, 2004.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDAN, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quím. Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.

PAROUL, N. Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico. Tese de Doutorado. Universidade de Caxias do Sul, RS - Brasil, 2011.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic

esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 331-337, 2011.

RODRIGUES, D. S.; CAVALCANTE, G. P.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase type b by adsorption on activated carbon. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 22, p. 125-133, 2008.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 16-24, 2012,

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 54-59, 2013.

SUN, J.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology*, v. 27, p. 53-58, 2010.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. *Enzimas Imobilizadas*. In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 35-86, 2004.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JANS, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, v. 2, p. 293-308, 1994.

AGRADECIMENTOS

A URI – Erechim, CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste estudo.