

# ENCAPSULAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* EM SILICA AEROGEL NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO PARA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS

A. S. BARBOSA<sup>1</sup>, J. A. LISBOA<sup>1</sup>, N. B. CARVALHO<sup>1</sup>, L. S. FREITAS<sup>2</sup>, A. T. FRICKS<sup>1</sup>, S. MATTEDI<sup>3</sup>, A. S. LIMA<sup>1</sup>, E. FRANCESCHI e C. M. F. SOARES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa

<sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química

<sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: andinhobarbosa@hotmail.com

**RESUMO**—O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de líquido iônico prótico – LIP (pentanoato de N-metilmonoetanolamina - C<sub>5</sub>) na lipase de *Burkholderia cepacia*(LBC) imobilizada por encapsulação em sílica aerogel modificado. Nas reações de transesterificação foram utilizados etanol:óleo de girassol (7:1) e 20% m/m de biocatalisadores imobilizados (BIs) (40°C, 80rpm, 8-96h). Os ésteres etílicos foram analisados por cromatografia em fase gasosa (FID). Os BIs na ausência de LIP não apresentaram conversão de ésteres etílicos. Após a adição do LIP na preparação do BI obteve-se a conversão máxima de ésteres etílicos de 48% em 48h. Os suportes e BIs foram caracterizados morfologicamente pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), análise físico-química por termogravimetria (TG) e composição química (FTIR). As caracterizações evidenciaram a eficiência do líquido iônico prótico na formação do aerogel e a presença da lipase nestes sistemas imobilizados.

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas seletivas utilizadas como biocatalisadores em bioprocessos por meio de diversas reações, como: hidrólise, esterificação, transesterificação, entre outras. A utilização de matrizes sol-gel para a encapsulação de enzimas permite a estabilização da estrutura terciária da proteína, devido à reticulação do gel (SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, alguns estudos demonstraram que a atividade enzimática de lipases imobilizados pela técnica sol-gel apresentam melhores resultados quando a secagem é realizada em meio supercrítico (aerogel) quando comparados à secagem tradicional (xerogel) (PIERRE e BUISSON, 2001; REETZ *et al.*, 1996).

O aerogel por possuir a base em sílica, sendo extremamente poroso com uma área de superfície específica muito alta e volumes e diâmetros de poros maiores quando comparados a outros suportes, se tornou um suporte muito interessante e viável para a imobilização de biomoléculas (NOVAK *et al.*, 2003). Uma nova e promissora possibilidade é a utilização de aditivos, como os líquidos iônicos (LI) nos diferentes métodos de imobilização de enzimas utilizando a técnica sol-gel (LEE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

A aplicação de aditivos durante o processo de síntese de suportes e biocatalisadores imobilizados é uma área de pesquisa ainda recente, pois, uma das principais funções dos mesmos é a formação de uma matriz ordenada na síntese de sol-gel, que além de poder proteger as enzimas da inativação por diversos efeitos durante o processo de imobilização, pode ainda aumentar a sua estabilidade operacional (SOARES *et al.*, 2005).

Dentre os aditivos destacam-se os líquidos iônicos (LI) que devido a excelentes propriedades como: baixa pressão de vapor e boa estabilidade dentro de um amplo intervalo de temperatura, o que impede a emissões de gases poluentes, são considerados uma boa alternativa como solventes, com potencial de aplicações a nível industrial, dentre elas, as que envolvem a biocatálise (ALVAREZ *et. al.* 2011; ASLANOV, 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso do LIP na LBC imobilizada por encapsulação em sílica aerogel modificada com LIP para a síntese de ésteres etílicos, além das características morfológicas e físico-químicas do biocatalisador imobilizado na sílica aerogel.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Imobilização da lipase**

A enzima utilizada foi a lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) ( $\geq 30,000$  U/g, pH 7,0, 50°C, adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich). A matriz pura aerogel (MP) e os biocatalisadores imobilizados por encapsulação (EN) foram obtidos pela técnica sol gel conforme descrito por Souza *et al.* (2013) para xerogel na ausência ou presença de 1% (m/v) de líquido iônico prótico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina - C<sub>5</sub>). A obtenção do aerogel foi realizada utilizando meio pressurizado com CO<sub>2</sub> nas seguintes condições de secagem: 100 bar, 25 °C e vazão de 2 mL/min.

### **2.2. Síntese de ésteres etílicos**

As reações foram realizadas em reatores fechados com capacidade de 25mL contendo 12g de substrato (óleo de girassol e etanol), na proporção de 7:1, sob agitação constante de 80rpm e temperatura de 40°C por até 96h. Foi utilizado 20% (m/m) de biocatalisador em relação à massa total de reagentes. Os ésteres de etila formados foram analisados por cromatografia em fase gasosa (FID) usando o modelo Varian CG 3800 (Varian, Inc., EUA). A conversão da transesterificação foi calculado levando em consideração a massa dos ésteres detectados por análise cromatográfica e a massa total teórica de ésteres baseado na razão molar da reação.

### **2.3. Caracterização Morfológica (BET) e Físico-Química (TG e FTIR)**

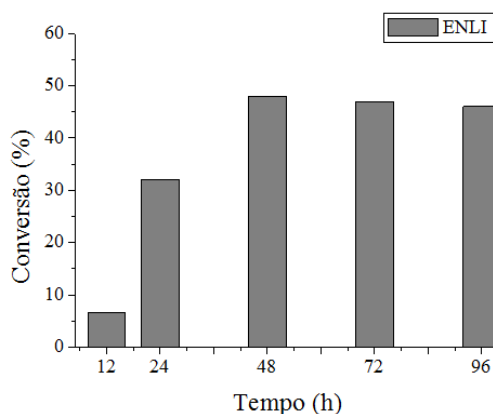
A análise morfológica da superfície das partículas das matrizes aerogéis e dos biocatalisadores imobilizados foi realizadas pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET) que determinou a área superficial específica (m<sup>2</sup>/g), diâmetro do poro (nm) e volume do poro (cm<sup>3</sup>/g). As perdas de massa foram determinadas por termogravimetria (TG, DTG-60H

Shimadzu). E a estrutura química dos sistemas foi investigada por infravermelho (espectrômetro FTIR BOMEM MB-100).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Síntese de ésteres etílicos

Na reação de transesterificação do óleo de girassol foram testados para a lipase encapsulada em sílica aerogel na presença (ENLI) e ausência (EN) de LIP a 40°C, 80 rpm, em até 96 horas (Figura 1). Os resultados mostraram que para os biocatalisadores imobilizados em aerogel na ausência de LIP (EN) não apresentaram conversão de ésteres etílicos, já o sistema imobilizado na presença de LIP verificou-se conversão de 48% de ésteres etílicos em 48h de reação. Esse comportamento pode ser explicado pela característica do LIP utilizado neste estudo, que por possuir um caráter hidrofóbico, possibilita a formação de uma camada de hidratação em torno da enzima favorecendo a atividade lipolítica e induzindo a água para mais próximo da enzima (SOUZA *et al.*, 2013). A técnica de encapsulação em aerogel foi utilizada por NASSARENDINE *et al.* (2008) para imobilização da lipase comercial de *Candida antarctica* e Lipozyme® na síntese utilizando óleo de semente de girassol no qual se observou 90 % de conversão de ésteres etílicos após 50 h aproximadamente.



**Figura 1.** Conversão de ésteres etílicos em função do tempo na reação de transesterificação do óleo de girassol e etanol (7:1) à 40°C e 80 rpm utilizando LBC encapsulada em sílica aerogel na presença de LIP.

Em estudos realizados anteriormente com a utilização da LBC imobilizada em sílica aerogel modificada com LI, os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram o efeito estabilizante do LI testado (C<sub>5</sub>) e confirmam dados da literatura, nos quais indicam um considerável aumento da atividade catalítica por meio da imobilização da lipase na presença de LIP (SOUZA *et al.*, 2013). A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a atuação do aditivo no processo de imobilização promove um aumento na eficiência catalítica da enzima e a minimização dos efeitos difusionais, possivelmente por promover a estabilização da mesma durante a liberação de álcool no processo de reticulação do alcóxido de silício na etapa de imobilização da enzima, além de proteger a matriz aerogel do encolhimento, do colapso dos poros da rede do gel e do caráter hidrofóbico do LI influenciando na interação entre a enzima e o suporte (SOUZA *et al.*, 2013).

### 3.2. Caracterização morfológica (B.E.T)

Na Tabela 1 observa-se a área superficial específica, volume e tamanho médio de poros para a matriz aerogel e lipase imobilizada em sílica aerogel na ausência e presença de LIP estão resumidos na Tabela 1. Para a matriz pura aerogel a presença de líquido iônico (ENLI) verificou-se efeitos positivos sobre o diâmetro e volume dos poros. Entretanto, o biocatalisador imobilizado com LIP apresentou a diminuição do volume e diâmetro de poros reduzidos ( $0,4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e  $5,9 \text{ nm}$ ) em comparação com o biocatalisador EN ( $0,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e  $8,2 \text{ nm}$ ) na ausência de LIP. Este efeito pode ser devido ao preenchimento maior dos poros pela lipase, devido a afinidade hidrofóbica do ácido pentanóico N-metilmonoetanolamina ( $\text{C}_5$ ) durante a contração, solidificação, na etapa de envelhecimento, a secagem em meio pressurizado do gel na interação entre a enzima e o suporte.

**Tabela 1.** Influência do líquido iônico prótico utilizado como aditivo em aerogel nas propriedades estruturais por adsorção-dessorção de nitrogênio para matriz pura e biocatalisadores imobilizados por diferentes métodos.

Ensaio	Área superficial específica ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	Volume dos poros ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )	Diâmetro dos poros (nm)
MP	81	0,04	1,1
MPLI	322	0,8	5,0
EN	131	0,5	8,2
ENLI	147	0,4	5,9

A utilização de sílica xerogel modificada com líquido iônico aprótico pode permitir a penetração da lipase no interior dos poros (por causa do aumento dos mesmos), e dessa forma elevar a carga de enzimas encapsuladas e, conseqüentemente, favorecendo o aumento da atividade de acordo com estudos realizados por Fernandez-Lafuente (2009). Um perfil semelhante foi observado também para xerogel por Vila-Real *et al.* (2011), onde a adição de líquidos iônicos apróticos da família dos imidazólios no processo de imobilização pela técnica sol-gel teve um papel importante no desempenho da enzima, por afetar as características estruturais do biocatalisador imobilizado.

Estudos realizados por Souza *et al.* (2013) relataram resultados inferiores em relação ao diâmetro e volume de poros na adição do líquido iônico  $\text{C}_5$  durante o processo de imobilização da lipase de BC em matriz xerogel quando comparados ao aerogel. Nestes resultados foram observados o alargamento dos poros de 3 para  $5,9 \text{ nm}$  e o volume de poros de  $0,08 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  para  $0,4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , minimizando assim os efeitos difusionais característicos desta técnica de imobilização confirmados pelo aumento da eficiência catalítica na síntese de ésteres etílicos (Figura 1). Este comportamento também foi relatado por Zarcu *et al.* (2010) durante a encapsulação de lipase numa matriz hidrofóbica, uma vez que os líquidos iônicos hidrofóbicos induzem alterações significativas na estrutura porosa do suporte do biocatalisador.

### 3.3. Caracterização físico-química

#### 3.3.1. Termogravimetria

A análise termogravimétrica fornece uma ferramenta importante para estudos da estrutura e da composição orgânica e da perda de água em função da degradação térmica da matriz pura, da lipase de *Burkholderia cepacia* livre e dos biocatalisadores imobilizados. Os termogramas foram divididos em três regiões para simplificar as discussões sobre a análise termogravimétrica (Tabela 2).

Região I, onde a temperatura chega até aproximadamente 200 °C, ocorre a perda de peso associada principalmente com a decomposição de grupos amino e a desidratação, geralmente grupos orgânicos. A Região II, que compreende entre 200 e 600°C, está associada com a condensação de grupos silanol e alguma perda de componentes orgânicos (C, H, O e N) sob a forma de compostos voláteis presentes ou formados até o início da decomposição biológica, incluindo a lipase e a presença de grupos silanois do TEOS não-reagido, que estão presentes na sílica, devido à incompleta reação sol-gel (MUKHERJEE *et al.*, 2009). E região III, onde a perda de massa é associada com as reações desidroxilação finais e de carbonização final de compostos orgânicos, acarretando na degradação completa do material ou sua estabilidade térmica (SOARES *et al.*, 2004).

**Tabela 2:** Perda total e parcial de massa observada na lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz aerogel na presença de líquido iônico prótico.

Ensaio	Região I (0 – 200°C)	Região II (200 – 600°C)	Região III (600 – 1000°C)	Perda total de massa (%)
BC Livre	8,32	82,32	9,16	99,81
MP	10,37	6,02	0,58	16,90
MPLI	41,98	3,67	0,65	46,31
EN	33,62	15,72	1,66	51,03
ENLI	16,74	19,40	1,91	37,99

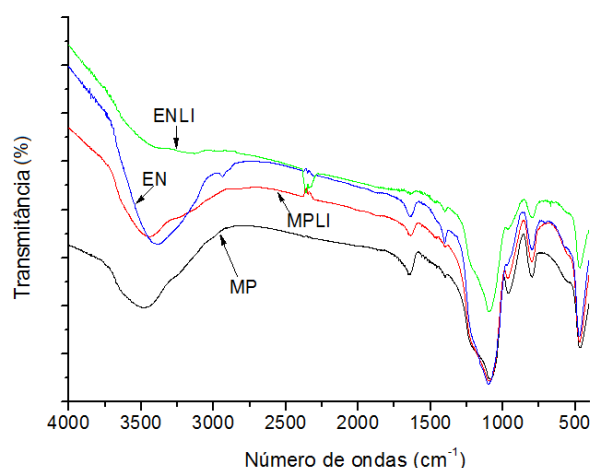
Na Tabela 2 pode-se observar que o valor obtido na perda de massa total foi de 16,90% para MP com a secagem em meio pressurizado, onde se verificou a maior perda de massa na região I, cerca de 10,37%, possivelmente devido a presença de água na superfície do suporte. Concomitantemente para MPLI, a maior perda parcial de massa ocorreu na região I (41,98%). O valor de perda de massa foi cerca de 4 vezes maior na região I quando comparado o MPLI com MP. Este comportamento pode estar associado ao uso do líquido iônico prótico, ao aumento da quantidade e diâmetro dos poros da matriz pura e por modificar a hidrofobicidade do microambiente dos poros que exercem influência no nível de umidade da mesma. Segundo Meera *et al.* (2011) perfil similar confirma os valores da região I apresentados na Tabela 2, que demonstram que matrizes preparadas com líquido iônico aprótico apresentam uma perda de massa maior na região I, quando comparados a matrizes sem o aditivo.

Para as amostras dos biocatalisadores imobilizados, observou-se uma tendência no aumento de perda de massa na região II (15,72% e 19,40% para EN e ENLI respectivamente) quando comparado com MP e MPLI (6,04 % e 3,67 %, respectivamente), possivelmente influenciados pela presença de água e alguma perda de componentes orgânicos nos interstícios do aerogel. Em temperaturas mais elevadas (Região III), a perda de massa foi insignificante, além disso, no caso de enzimas imobilizadas, essa região não é de interesse, devido à carbonização completa de compostos orgânicos, dentre eles a lipase (BARÃO *et al.*, 2013).

### 3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR das sílicas aerogéis e do biocatalisador imobilizado em sílica aerogel preparados na ausência e presença de LIPs são apresentados na Figuras 2. O espectro de suporte aerogel deste estudo e o xerogel obtido pela mesma técnica por Souza *et al.* (2013) foram observadas bandas similares determinadas nos comprimentos de onda entre 1000-1100 que corresponde à ligação Si-O-R, 650  $\text{cm}^{-1}$  (Si-O-Si), 800  $\text{cm}^{-1}$  (Si-O-Si), 450  $\text{cm}^{-1}$  (Si-O) e dos grupos - OH na faixa entre 3400 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ . Para os espectros obtidos para os biocatalisadores imobilizados mostram que além das bandas características dos grupos silanóis, a presença de bandas nas faixas de comprimento de onda entre 1600 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), 1390  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a grupos C - H com ligações de  $\text{CH}_3$  e 695  $\text{cm}^{-1}$  (amida IV e/ou V) evidenciando a eficiência da imobilização das lipases de BC na matriz aerogel.

De acordo com a literatura, as bandas características do estiramento da ligação N-H de amida I são referentes às vibrações de estiramento da ligação C=O acoplada ao estiramento da ligação C-N. Estes modos vibracionais são sensíveis para ligação de hidrogênio e acoplamento entre transição dipolar das ligações peptídicas adjacentes e, portanto, são sensíveis à estrutura secundária da enzima. As amidas IV e V são, respectivamente, devido à ligação OCN e ao redor do plano de ligação -NH (PORTACCIO *et al.*, 2011; MOHIDEM & MAT, 2011).



**Figura 2.** Espectro de FTIR para sílica aerogel (MP e MPLI) e biocatalisadores imobilizados em matriz aerogel na ausência (EN) e presença (ENLI) de líquido iônico prótico.

## 4. CONCLUSÃO



A análise da eficiência catalítica e avaliação das propriedades físico-químicas e morfológica mostraram o efeito positivo do líquido iônico na imobilização, na qual se verificou a conversão em ésteres etílicos somente após a adição do LIP na preparação do BI. Esse comportamento pode ser justificado pela minimização dos efeitos difusionais devido o aumento do volume e tamanho de poros e a interação entre a lipase e a sílica aerogel pelo caráter hidrofóbico do LIP.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. *Journal Chemistry Thermodynamics*, v. 43, p. 997–1010, 2011.
- ASLANOV, L. A. Ionic liquids: Liquid structure. *Journal of Molecular Liquids*, v. 162, p. 101–104, 2011.
- BARÃO, C.E.; DE PARIS, L. D.; DANTAS, J. H.; PEREIRA, M. M.; FILHO, L. C.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SOARES, C. M. F. Characterization of biocatalysts prepared with *Thermomyces lanuginosus* lipase and different silica precursors, dried using aerogel and xerogel techniques. *Applied Biochemistry Biotechnology*, DOI: 10.1007/s12010-013-0533-3, 2013.
- FERNANDEZ-LAFUENTE R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 405–18, 2009.
- LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; HA, S. H. H.; CHANG, W. J. Influence of ionic liquids as additives on sol–gel immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 47, p. 129–134, 2007.
- MOHIDEM N. A.; MAT H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol–gel silica with additives. *The Journal of Sol-Gel Science and Technology*, DOI 10.1007/s10971-011-2596-3, 2011.
- MUKHERJEE I.; MYLONAKIS A.; GUO Y.; SAMUEL S.P.; LI S.; WEI R.Y.; KOJTARI A.; WEI Y. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 122, p. 168–174, 2009.
- NASSREDDINE, S.; KAROUT, M.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A.C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. *Journal Applied Catalysis A: General*, v. 344, p. 70–77, 2008.
- NOVAK, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V.; KNEZ, Z. Silica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub-and supercritical conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 27, p. 169–178, 2003.
- PIERRE, A.; BUISSON, P. Influence of the porous texture of silica gels on the enzymatic activity of lipases in esterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 639–647, 2001.

PORTACCIO, M.; DELLA-VENTURA, B.; MITA, D. G.; MANOLOVA, N.; STOILOVA, O.; RASHKOV, I.; LEPORE, M. FT-IR microscopy characterization of sol-gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *The Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 57, p. 204–211, 2011.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 527-534, 1996.

SOARES, C. M. F. ; CASTRO, H. F.; ITAKO, J. E.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel bioencapsulates for hydrolysis and synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 845-859, 2005.

SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A., OLIVO J.E., CASTRO, H. F.; MORAES, F.F., ZANIN, G.M. Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic*, v. 29, p. 69-79, 2004.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-150, 2013.

SOUZA, R. L.; RESENDE, W.C.S.; BARÃO, C.E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SANTOS, O.A.A. ; FRICKS, A.T. ; ITP/UNIT, R. T. F. -. P.; LIMA, A.S. ; SOARES, C. M. F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP - 001. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 84, p. 152-159, 2012.

VILA-REAL H.; ALFAIA A. J.; ROSA J. N.; GOIS P. M. P.; ROSA M. E.; CALADO A. R. T.  $\alpha$ - Rhamnosidase and  $\alpha$ -glucosidase expressed by naringinase immobilized on new ionic liquid sol-gel matrices: activity and stability studies. *Journal of Biotechnology*, v. 152, p. 147–58, 2011.

ZARCULA C.; CORÎCI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A.; PETER, F.; Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 65, p. 79–86. 2010.

ZARCULA, C.; CROITORU, R.; CORÎCI, L.; CSUNDERLIK, C.; PETER, F.. Improvement of Lipase Catalytic Properties by Immobilization in Hybrid Matrices. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 52: p. 179 - 184, 2009.