

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL PARA APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

K. F. CAVALCANTE¹, F. A. PEREIRA², L. R. B. GONÇALVES¹, W. S. ADRIANO²

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Fortaleza-CE-Brasil

² Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Saúde, Cuité-PB- Brasil
E-mail para contato: wellington.adriano@ufcg.edu.br

RESUMO – Lipases, triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3, são enzimas que atuam nas ligações ésteres de triacilgliceróis, liberando ácidos orgânicos e glicerol. Uma limitação da utilização destas enzimas reside na falta de estabilidade operacional e na impossibilidade de sua reutilização na forma livre. Visando contornar problemas como este, foram feitos estudos sobre imobilização de enzimas. Neste trabalho foram desenvolvidos derivados de lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em organo-géis, produzidos à base de gelatina (Gel), alginato (Alg) ou quitosana (Qui), fases orgânicas hexano (Hex) ou heptano (Hep) e os tensoativos dodecilsulfato de sódio (SDS) ou brometo de acetilmetilamônio (CTABr). Os derivados foram caracterizados quanto: fator de estabilidade a 60°C, eficiência e rendimento de imobilização. Os melhores biocatalisadores apresentaram eficiência e fator de estabilidade de 4,1% e 30 vezes (Gel/SDS/Hex), 6,0% e 1,3 vezes (Alg/SDS/Hep) e 1,0% e 2,3 vezes (Qui/SDS/Hep).

1. INTRODUÇÃO

As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão atingindo velocidades de reação bastante superior ao catalisadores químicos convencionais (KRAJEWSKA, 2004; HASAN, *et al.*, 2006). Em sua forma solúvel, muitas enzimas não são suficientemente estáveis nas condições de reações desejáveis, devido a fatores como agitação mecânica, presença de solventes, altas temperaturas, pH, necessidade de cofatores e sua inibição por altas concentrações de substrato e produtos, provocando a perda de sua atividade e especificidade. Visando contornar esse problema e promover a reutilização destas enzimas têm sido realizados estudos sobre imobilização de enzimas (VOLPATO, 2009).

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam catalisando a hidrólise de lipídeos para liberar ácidos orgânicos e glicerol (MENDES *et al.*, 2013). Também são capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos (YAHYA *et al.*, 1998, PAIVA *et al.*, 1997).

Recentemente tem-se investigado o potencial catalítico de lipases imobilizadas em organo-géis, onde é obtido pela mistura de uma solução de polímero em água, solvente orgânico e tensoativo. Neste sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) do organo-gel, eliminando os problemas como de estabilização da enzima contra inativação por um solvente

não-aquoso. O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração relativa do polímero e água (JESUS *et al.*, 1997).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar derivados de lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em organo-géis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Como suportes para imobilização utilizou-se gelatina em pó incolor sem sabor, alginato de sódio P.A e quitosana em pó (grau de desacetilação de 85, 9%). Para a preparação dos suportes, utilizaram-se os reagentes: hexano P.A, N- heptano P.A), dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de acetilmetilamônio (CTABR), ácido acético glacial 95%, álcool etílico P.A, dentre outros reagentes todos de grau analítico e de diversas marcas. Como agente ativante utilizou-se o glutaraldeído 25 % (v/v).

2.2 Métodos

Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando gelatina em pó: A metodologia utilizada foi adaptada de DALLA-VECCHIA *et al.*, (2004). Adicionou-se 100 µL de enzima em 1 mL de água destilada e 0,2g de gelatina, a mistura foi realizada a 50°C. Dissolveu-se 0,04g do tensoativo em 4 mL da fase orgânica. Os sistemas foram agitados por 10 minutos e armazenados em geladeira por 5 minutos.

Preparação do organo-gel utilizando gelatina seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v): O preparo do organo-gel foi de acordo com o descrito anteriormente, sem adição da enzima. Em seguida ativados com glutaraldeído 2% (v/v) em tampão fosfato 20 mM, pH 8,0, sob agitação a 25°C por 10 minutos. O suporte foi lavado com água destilada para remoção do glutaraldeído residual e filtrado a vácuo.

Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando alginato de sódio: 0,04g de alginato de sódio e 2 mL de água destilada foram misturados por 10 minutos. Mediu-se 0,04g do tensoativo (SDS), 4 mL da fase orgânica e adicionou-se 180 µL da enzima. Em seguida, o organo-gel foi submerso em solução de CaCl₂ 5% (m/v) por 5 minutos, para que ocorresse a coagulação do alginato e formação de partículas. Lavou-se o organo-gel com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, com a fase orgânica e filtrado a vácuo.

Preparação do organo-gel utilizando alginato de sódio seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v): O organo-gel foi preparado de acordo com o descrito no item anterior, sem adição da enzima. Foi realizado o processo de imobilização nos suportes produzidos. Os suportes foram lavados com água destilada e secos em bomba a vácuo e suspensos em soluções de glutaraldeído 2% (v/v) por 10 minutos. O suporte foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo.

Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando quitosana em pó: Preparou-se uma solução de ácido acético 5% (v/v), pH ajustado para 5,0 e adicionou-se quitosana até

concentração de 5% (m/v). Mediu-se 0,04g do tensoativo SDS, 1 mL da fase orgânica, adicionou-se a enzima e 4 g da solução de quitosana. O organo-gel foi colocado em geladeira por 20 minutos, decorrido o tempo adicionou-se tampão bicarbonato de sódio 25 mM, pH 10,0 por 30 minutos, para que ocorresse a neutralização do pH e coagulação da quitosana, em seguida adicionou-se em álcool etílico 99,5% por 10 minutos, até ficar com consistência de gel, em seguida lavado com o solvente e filtrado a vácuo.

Processo de imobilização da enzima ao suporte: A imobilização da lipase nos suportes ativados com glutaraldeído 2% (v/v) foi feita através do contato desses suportes com uma solução de enzima, carga oferecida 50 U/g de gel, dissolvida em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8, na razão de 1/10 (m/v), incubados a 25°C por 3 horas. Decorrido tempo, os derivados foram lavados com água destilada e secos a vácuo.

Determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada: A atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada foi determinada pela hidrólise do pNPB, avaliada espectrofotometricamente com comprimento de onda 400 nm, de acordo com a Equação 1 (OLIVEIRA, 2012).

$$At = \frac{(\alpha - \alpha_{branco}) \times 0,0922 \times V_{reator} (mL)}{V_{enzima} (mL) \text{ ou } m_{derivado} (g)} \quad (1)$$

Estabilidade térmica: Para a avaliação da estabilidade térmica da lipase na forma solúvel, adicionou-se 0,2 mL da enzima em 2 mL tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 à 60°C. As amostras foram retiradas em tempos estabelecidos e colocados em banho de gelo para interromper o processo de inativação e em seguida suas atividades foram determinadas. Para os ensaios feitos com a enzima imobilizada, mediu-se 0,1g do derivado incubado em 1 mL da fase orgânica e incubados à 60°C, retirados e colocados em banho de gelo. Em seguida, foi seco em bomba a vácuo e medida a atividade.

Parâmetros de inativação térmica e parâmetros de imobilização: Foi utilizado o ajuste exponencial não linear proposto por SADANA-HENLEY (1982) de acordo com a Equação 2, em seguida calculado a atividade relativa, tempo de meia-vida e fator de estabilidade. Para todos os derivados determinou-se a eficiência de acordo com a Equação 3 e para os derivados ativados com glutaraldeído 2% (v/v), determinou-se o rendimento de imobilização conforme Equação 4.

$$A_r = (1 - \alpha) \times e^{-k_d \times t} + \alpha \quad (2)$$

$$E(\%) = \frac{At_{derivado}}{Carga Oferecida} \times 100 \quad (3)$$

$$RI(\%) = \frac{(At_o - At_f)}{At_o} \times 100 \quad (4)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi medida a atividade hidrolítica da lipase de *Rhizomucor miehei*, apresentando um valor de $250,5 \pm 1,9$ U_{PNPB}.mL⁻¹ de extrato enzimático ($6,87 \pm 0,01$ mg de Proteína.mL⁻¹ de extrato enzimático).

3.1 Caracterização Da Lipase De *Rhizomucor Miehei* Imobilizada Em Organo-Géis À Base De Gelatina

Os derivados preparados a partir da gelatina em pó apresentaram resultados de acordo com a Tabela 1. Observa-se que o melhor derivado obtido foi usando SDS como tensoativo e hexano como fase orgânica visto que o valor de eficiência foi de 4,1 %, com fator de estabilidade de 30 vezes.

Tabela 1- Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativos SDS ou CTABr. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t_{1/2}) Tempo de meia-vida

Derivados	Carga Oferecida (U/g)	E (%)	At _{Der} (U _{PNPB} /g)	t _{1/2} (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	-	0,4	1,0
Gel/SDS/Hex	$37,8 \pm 1,4$	$4,1 \pm 1,9$	$1,4 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,9$	$30 \pm 2,6$
Gel/CTABr/Hex	$38,1 \pm 4,7$	$0,7 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,2$	nd	nd
Gel/SDS/Hep	$53,0 \pm 1,3$	$2,7 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,8$	$13,1 \pm 8,4$	$31,2 \pm 2,0$
Gel/CTABr/Hep	$61,2 \pm 2,4$	$0,5 \pm 0$	$0,3 \pm 0,1$	nd	nd

*nd: não determinado

3.2 Caracterização Da Lipase De *Rhizomucor Miehei* Imobilizada Em Organo-Géis À Base De Gelatina Ativados Com Glutaraldeído 2% (V/V)

De acordo com a Tabela 2, Observa-se que o derivado que apresentou melhores resultados foi Gelatina/SDS/Heptano/Glutaraldeído devido ao fator de estabilidade de 68,3 vezes mais estável que a enzima solúvel, apresentando tempo de meia-vida e rendimento de 28,6 minutos e 71,2%, respectivamente.

Tabela 2- Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis a base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativo SDS ou CTABr, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização

Derivados	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE	RI (%)
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0	-
Gel/SDS/Hex/Glu	$1,1 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,07$	$7,5 \pm 0,4$	$17,8 \pm 0,9$	$77,0 \pm 2,4$
Gel/CTABr/Hex/Glu	$0,1 \pm 0$	$0,06 \pm 0$	nd	nd	nd
Gel/SDS/Hep/Glu	$0,8 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,07$	$28,6 \pm 1,1$	$68,3 \pm 2,8$	$71,2 \pm 6,2$
Gel/CTABr/Hep/Glu	$0,06 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	nd	nd	nd

*nd: não determinado

3.3 Caracterização Da Lipase De *Rhizomucor Miehei* Imobilizada Em Organogéis À Base De Alginato De Sódio

Observando-se a Tabela 3, verifica-se que os derivados produzidos obtiveram resultados bem próximos, o derivado Alginato/SDS/Heptano destaca-se por apresentar uma maior eficiência que o Alginato/SDS/Hexano, 6,0% e 4,3 %, respectivamente. Observa-se que os dois derivados obtiveram valores de fator de estabilidade de aproximadamente 1,3 vezes.

Tabela 3- Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida

Derivados	Carga Oferecida (U/g)	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	-	0,4	1,0
Alg/SDS/Hex	$18,2 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,7$
Alg/SDS/Hep	$14,1 \pm 0,6$	$6,0 \pm 1,0$	$0,8 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$

3.4 Caracterização Da Lipase De *Rhizomucor Miehei* Imobilizada Em Organogéis À Base De Alginato De Sódio Ativados Com Glutaraldeído 2% (V/V)

A Tabela 4 mostra que o derivado Alginato/SDS/Hexano/Glutaraldeído apresentou valores de rendimento e eficiência 82,6 % e 0,5 % m/v, respectivamente. Já Alginato/SDS/Heptano/Glutaraldeído apresentaram valores de rendimento 60,6 % e eficiência 1,0 %.

Tabela 4- Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g⁻¹ de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização

Derivados	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE	RI (%)
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0	-
Alg/SDS/Hex/Glu	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,05	0,3 ± 0,1	82,6 ± 5,5
Alg/SDS/Hep/Glu	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,04	60,6 ± 1,9

3.5 Caracterização Da Lipase De *Rhizomucor Miehei* Imobilizada Em Organogéis À Base De Quitosana

Pode-se observar, de acordo com a Tabela 5, que os derivados à base de quitosana obtiveram resultados bem próximos, tendo maior destaque o derivado Quitosana/SDS/Heptano, pois apresentou melhores resultados, quando comparado com o derivado Quitosana/SDS/Hexano, de fator de estabilidade e tempo de meia-vida de 2,3 e 1,0 minutos, respectivamente. As eficiências de ambos os derivados apresentaram valores em torno de 1,0%.

Tabela 5- Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de quitosana, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Carga oferecida 50 U.g⁻¹ de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida

Derivados	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0
Qui/SDS/Hex	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,05	0,8 ± 0,08	1,8 ± 0,2
Qui/SDS/Hep	1,0 ± 0,07	0,5 ± 0,03	1,0 ± 0,3	2,3 ± 0,6

3.6 Determinação Dos Melhores Biocatalisadores

Com base nos estudos feitos com os derivados produzidos a partir dos polímeros gelatina, alginato e quitosana, selecionaram-se os melhores biocatalisadores, Gelatina/SDS/Hexano, Alginato/SDS/Heptano, Quitosana/SDS/Heptano, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 6. Foram selecionados os biocatalisadores produzidos pelo método de microencapsulação, onde a enzima encontra-se confinada dentro do centro micelar dos organo-géis.

Tabela 6-Seleção dos melhores biocatalisadores. Sendo (E) Eficiência, ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) Fator de Estabilidade

Derivados	E (%)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Gel/SDS/Hex	$4,1 \pm 1,9$	$12,7 \pm 0,9$	$30,0 \pm 2,6$
Alg/SDS/Hep	$6,0 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
Qui/SDS/Hep	$1,0 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,6$

A Figura 1 mostra os perfis de inativação térmica a 60 °C dos melhores biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de gelatina, alginato e quitosana. As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

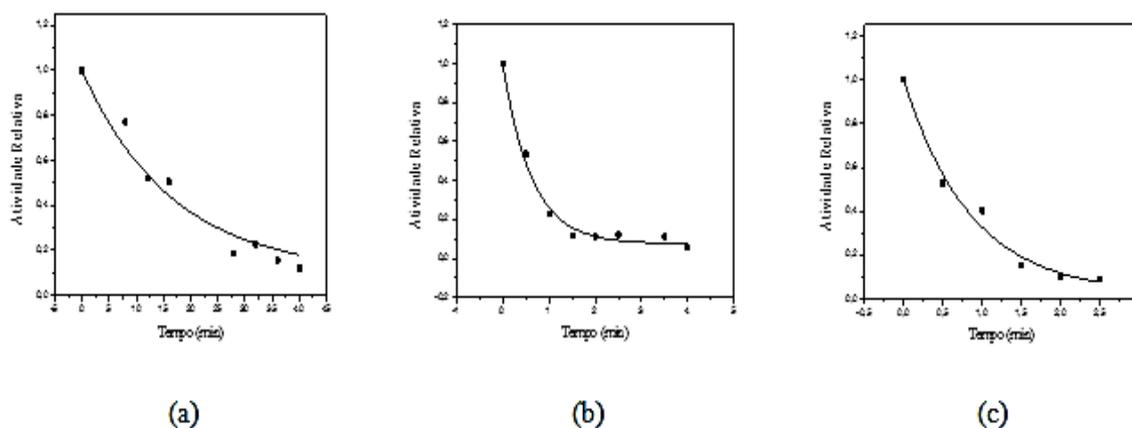


Figura 1- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Gelatina/SDS/Hexano, (b) Alginato/SDS/Heptano e (c) Quitosana/SDS/Heptano.

4. CONCLUSÃO

Foi avaliada a estabilidade térmica como uma estratégia para escolha dos melhores derivados, observou-se que os derivados que obtiveram melhor desempenho foram Gel/SDS/Hex que apresentou eficiência de 4,1%, tempo de meia-vida de 12,7 minutos e 30 vezes mais estável que a enzima na sua forma livre, Alg/SDS/Hep apresentou eficiência 6,0%, tempo de meia-vida 0,5 minutos e 1,3 vezes mais estável, Qui/SDS/Hep apresentou eficiência 1,0%, tempo de meia-vida 1,0% e 2,3 vezes mais estável.

A metodologia de imobilização seguida de ativação por glutaraldeído 2% (v/v), apesar de apresentar bons resultados de rendimento, tempo de meia-vida e fator de estabilidade, não apresentou boa atividade do derivado e eficiência causada pela redução dos poros após reticulação, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo. O uso do brometo de

hexadeciltrimetilamônio (CTABr) não apresentou bons resultados, devido inativação da enzima causado pelo tensoativo.

5. REFERÊNCIAS

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

HASAN, F.; SHAH, A.A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*; v. 39; p. 235, 2006.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. *Química Nova*, v. 20, p. 664-672, 1997.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.126-139. 2004.

MENDES, A. A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R. L.C. Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces Lanuginosus*. *Química Nova*, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

OLIVEIRA, U.M.F. Síntese de Ésteres de Interesse Comercial Utilizando Lipases Imobilizadas em Quitosana. 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

PAIVA, A. L; MALCATA, F. X. Integration of reaction and separation with lipases: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, p. 99-109, 1997.

SADANA, A., HENLEY, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes. *Ann N Y Acad Sci*, v. 501, p.73-79, 1987.

VOLPATO, G. Produção, Purificação e Imobilização de Lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 Produzidas em Glicerol. 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. *Enzyme Microbiology Technology*, v.23, p. 438-450, 1998.