

ESTUDO DA MASSA DE ÁGUA E ADITIVO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE *IN SITU* EM XEROGEL PRODUZIDO PELO MÉTODO SOL-GEL COM O USO DE TMOS COMO PRECURSOR

A. M. M. FICANHA¹, M. BOPSIN¹, K. L. LEVANDOSKI¹, N. L. D. NYARI¹, A. ANTUNES¹, A. PAULAZZI¹, M. MIGNONI¹ e R. M. DALLAGO¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: alinematuella@gmail.com

RESUMO – As aplicações de lipases em processos industriais se tornam cada vez mais importante devido o valor comercial desta enzima. Para melhorar e tornar um biocatalisador mais estável é possível utilizar técnicas imobilização. Essa técnica mantém a atividade catalítica da enzima, além de melhorar a eficácia e estabilidade operacional. O método sol-gel para imobilização é simples e permite a adição de aditivos no processo de imobilização a fim de aumentar a eficiência deste tipo de imobilização da lipase. A principal área de aplicação destes biocatalisadores heterogêneos diz respeito esterificação ou transesterificação em solventes orgânicos. A lipase de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada pela técnica de sol-gel utilizando o precursor tetrametoxisilano (TMOS) para obtenção do xerogel imobilizado. O objetivo do trabalho foi estudar a influência da massa de água e aditivo utilizado na imobilização. A imobilização da lipase CAL B utilizando o precursor silano TMOS e o aditivo PEG no processo de sol-gel foi bem-sucedida. A adição de PEG com o aumento da massa de água fez com que a atividade de esterificação variasse de 150 a 380 U e o rendimento de imobilização 80 a 600 %. Isto demonstra que o aditivo teve influência positiva na imobilização e preservação da estrutura da enzima.

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas de grande interesse na biocatálise para a síntese de uma variedade de compostos com aplicação na indústria de alimentos e aromas, produtos farmacêuticos, produtos de química fina, entre outros (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Essas enzimas na sua forma livre, podem ser usadas apenas uma vez em solução aquosa, desta forma, a imobilização pode auxiliar nesse aspecto, pois permite a sua reutilização, facilidade na separação do produto da reação, uso em batelada e estabilidade mecânica, térmica e de armazenagem (Mendes *et al.*, 2011).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima,

porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Soares *et al.*, 2002).

A técnica de sol-gel consiste em reter a enzima no interior da matriz ou em sua superfície a fim de conferir estabilidade mecânica e bioquímica superior às técnicas convencionais. O processo de sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois se trata de uma rota de síntese de materiais onde em um determinado momento ocorre a transição do sistema sol para um sistema gel (Hiratsuka *et al.*, 1995). A imobilização da enzima no interior das matrizes produzidas pelo processo de sol-gel é uma técnica vantajosa, pois reserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação (Alfaya e Kubota, 2002).

Os precursores silanos mais amplamente utilizados na imobilização enzimática são os alcoxissilanos, tais como tetrametoxissilano (TMOS) e tetraetoxissilano (TEOS). O TEOS e o TMOS são os precursores mais comumente utilizados para sintetizar silicatos, suas hidrólises em soluções aquosas, associados às reações de policondensação adicionais, podem causar uma formação de partículas de sol, conduzindo à auto-organização em uma rede tridimensional porosa (Brinker e Scherer, 1990; Chaudhury *et al.*, 2007).

O uso de aditivos visa melhorar a atividade catalítica da enzima e a sua estabilidade (Chen e Lin, 2003; Fu *et al.*, 2010). O uso de aditivos como agentes de proteção é um meio simples, rápido e econômico para melhorar a estabilidade e atividade catalítica da enzima (Fu *et al.*, 2010). Jin e Brennan (2002) demonstraram que, a fim de melhorar ainda mais a atividade de enzimas de sol-gel, os aditivos podem ser introduzidos em sol-gel baseado em sílica com o objetivo de proteger as enzimas de desnaturação efeitos através da formação de um escudo entre a proteína e ambiente reativo. Vale salientar que os aditivos não ativam a enzima, em vez disso, apresentam um efeito estabilizante que previne a desativação desta quando de sua interação com o suporte (Reetz *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1998; Villeneuve *et al.*, 2000).

O objetivo do trabalho foi estudar a massa da água e do polietilenoglicol (PEG) utilizado como aditivo na imobilização *in situ* da lipase comercial *Candida antarctica* B (CALB) em xerogel produzido pelo método sol-gel, com o uso do TMOS como precursor da sílica. Avaliou-se como resposta o rendimento e atividade de esterificação na síntese de oleato de etila.

2. METODOLOGIA

2.1 Imobilização

A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario *et al.* (2009). Os suportes foram preparados solubilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTMABr) em água (diferentes concentrações, solução enzimática e em algumas amostras solução do aditivo PEG 1500 (1 % m/v). Essa solução foi submetida por 1 h sob agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm. Após este período, foi adicionado TMOS e etanolamina. Posteriormente, a solução foi submetida novamente a agitação, em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm, por um período de 24 h para completar a secagem do biocatalisador imobilizado.

Foram realizados testes de volume total de água utilizada na formação do suporte com TMOS, este variou de 10 a 18 mL (10, 12, 15 e 18 mL). O volume total de água foi formado pela solução enzimática adicionada (2 mL), solução do aditivo PEG 1500 (1 mL) e o restante de água destilada.

2.2 Medida da atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação de síntese de oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar 1:1, conforme descrito por Ferraz et al. (2012). A reação foi iniciada pela adição do xerogel imobilizado (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 min. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M até o meio atingir pH 11. Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 1:

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c} \quad (1)$$

Onde: AE : Atividade de esterificação (U/g); Va : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL); Vb : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL); M : Molaridade da solução de NaOH; Vf : Volume final de meio reacional (mL); t : Tempo (minutos); m : Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g); Vc : Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

2.3 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento do derivado imobilizado foi calculado a partir da Equação 2:

$$R(\%) = \frac{AT}{AA} \times 100 \quad (2)$$

Onde: AT: Atividade de esterificação total do xerogel imobilizado; AA: Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a secagem do xerogel, foram realizados testes para determinação da atividade de esterificação dos xerogéis imobilizados e o cálculo do rendimento. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividade de esterificação (AE) adicionada e dos xerogéis imobilizados em diferentes massas de água, com e sem o uso do aditivo e o rendimento de imobilização.

Amostra	Peso seco xerogel (g)	AE adicionada (U)	AE (U/g)	AE total (U)	Rendimento (%)
10 mL água com PEG	5,28	550,45	270,00	1426,41	259,14
10 mL água sem PEG	4,10	550,45	151,14	619,24	112,50
12 mL água com PEG	5,96	550,45	294,21	1753,06	318,48
12 mL água sem PEG	4,27	550,45	164,69	703,85	127,87
15 mL água com PEG	7,66	550,45	362,15	2774,07	503,97
15 mL água sem PEG	3,48	550,45	176,17	612,30	111,24
18 mL água com PEG	8,61	550,45	380,61	3275,56	595,07
18 mL água sem PEG	6,52	550,45	301,16	1962,14	356,46

Observa-se na Tabela 1 que o valor da atividade adicionada na imobilização de 550 U. A AE dos xerogéis imobilizados variaram de aproximadamente 150 a 380 (U/g). Quando comparado o uso do PEG como aditivo, em todos os xerogéis, independente da massa de água, observou-se um aumento da AE e do peso seco do xerogel.

Os resultados obtidos demonstram que o efeito estabilizante do aditivo (PEG) estão coerentes com a literatura, que demonstram um aumento da atividade catalítica quando o suporte é tratado com polímeros orgânicos (Keeling-Tucker *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2002). O uso de aditivos PEG aumenta a atividade catalítica, de acordo com Soares *et al.* (2001) e Soares *et al.* (2003), quando, em seus estudos, a lipase *Candida rugosa* foi covalentemente imobilizada sobre sílica-silanizada de poro controlado.

Observa-se que os rendimentos de imobilização para a atividade de esterificação nos xerogéis imobilizados variaram de aproximadamente 110 a 600 %. Observa-se que os maiores rendimentos encontram-se nos ensaios com o uso do aditivo PEG. O rendimento de imobilização também aumenta com o aumento da massa de água utilizada na imobilização nestes ensaios com o uso de aditivo.

Esse resultado de rendimento pode ser devido a utilização de macromoléculas tais como polietilenoglicol (PEG) no processo de imobilização para induzir uma melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato da enzima imobilizada com o meio reacional, favorecendo as condições reacionais, com consequência o aumento da atividade e do rendimento (Rocha *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2006; Mohidem *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014).

O presente trabalho apresentou valores maiores de rendimento dos quais encontrados na literatura, além de mostrar o efeito positivo do PEG sobre o processo de imobilização da CALB, o que confirma os dados da literatura que indicam aditivos de baixa massa molecular, tais como o PVA e PEG aumentam a atividade catalítica de enzimas (Soares *et al.*, 2003; Mohidem *et al.*, 2012).

3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo do uso de diferentes massas de água e de aditivo na imobilização *in situ* da lipase CALB em xerogel demonstram a importância do estudo e os efeitos destes fatores no aumento da atividade e do rendimento da imobilização. A adição de PEG com o aumento da massa de água fez com que a atividade de esterificação variasse de 150 a 380 U e o rendimento de imobilização de 110 a 600 %. Isto demonstra que a massa de água, juntamente com o aditivo, apresenta influência positiva para este tipo de imobilização.

4. REFERÊNCIAS

- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. T. A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quím. Nova.*, v. 25, p. 935-841, 2002.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol-Gel Science- The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press. Inc.: San Diego, 1990.
- CHAUDHURY, N. K.; GUPTA, R.; GULIA, S. Sol-gel technology for sensor applications. *Defence Sci. J.*, v. 57, p. 241-253, 2007.
- CHEN, J. P.; LIN, W. S. Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 32, p. 801-811, 2003.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. 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. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FU, D.; LI, C.; LU, J.; RAHMAN, A.; TAN, T. Relationship between thermal inactivation and conformational change of *Yarrowia lipolytica* lipase and the effect of additives on enzyme stability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 66, p. 136-141, 2010.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O Processo Sol-Gel: uma visão físico-química. *Quím. Nova*, v. 18, p. 171-180, 1995.
- JIN, W.; BRENNAN, J. D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta.*, v. 461, p. 1-36, 2002.
- KEELING-TUCKER, T.; RAKIC, M.; SPONG, C.; BRENNAN, J. D. Activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organo silane and polymer doping. *Chem. Mat.*, v. 12, p. 3695-4704, 2000.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Micropor. Mesopor. Mat.*, v. 118, p. 334-340, 2009.

- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quím. Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.
- MOHIDEM, N. A.; MAT, H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, v. 61, p. 96-103, 2012.
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 527-534, 1996.
- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. *J. Biotechnol.*, v. 66, p.61-67, 1998.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 91, p. 703-718. 30, 2001.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 98-100, p. 863-874, 2002.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Covalent coupling method for lipase immobilization on controlled pore silica in the presence of non-enzymatic proteins. *Biotechnol. Progress.*, v. 19, p. 803-807, 2003.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 39, p.69-76, 2006.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A. Use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 117, p. 301-306, 2014.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J. C. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.