

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COMERCIAL EM XEROGEL OBTIDO PELA TÉCNICA SOL-GEL COM TRÊS DIFERENTES INICIADORES DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO

A. M. M. FICANHA¹, A. ANTUNES¹, N. L. D. NYARI¹, K. L. LEVANDOSKI¹, M. BOPSIN¹, R. ZAMADEI¹, 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 lipases podem ser eficientemente aprisionadas nos poros de silicatos hidrofóbicos obtidos pelo processo sol-gel. Este método é simples e barato, em que uma mistura de um precursor da sílica é hidrolisada por iniciadores da reação de polimerização na presença da enzima. Aditivos, tais como polietilenoglicol (PEG), aumentam a eficiência deste tipo de imobilização da lipase. A principal área de aplicação destes biocatalisadores heterogêneos diz respeito esterificação ou transesterificação em solventes orgânicos. Para a imobilização, o precursor da sílica tetraetilortosilicato (TEOS) foi dissolvido em álcool etílico absoluto, e testados os três diferentes iniciadores da reação de polimerização: ácido (HCl), básico (HBr) e nucleofílico (NH₄OH). As determinações das atividades de esterificação foram realizadas na síntese de oleato de etila na solução enzimática (enzima livre) e nos xerogéis imobilizados armazenados em temperatura ambiente e refrigeração. Os resultados dos ensaios de estabilidade confirmaram a tendência do processo de imobilização de enzimas, ou seja, a imobilização conferiu uma maior estabilidade da enzima imobilizada comparada com a enzima livre. No estudo foi possível verificar, também, que a presença de aditivo PEG influenciou no aumento do número de ciclos e os suportes mantiveram-se estáveis por mais tempo armazenada em refrigerador quando se utilizou os iniciadores da reação de polimerização nucleofílico e básico.

1. INTRODUÇÃO

A técnica de imobilização apresenta-se como uma alternativa para contornar limitações reacionais, pois permite a separação da enzima e, conseqüentemente, a sua utilização mais que uma vez, além de possibilitar uma maior estabilidade à enzima (Sabbani *et al.*, 2006; Wang e Hsieh, 2008).

No processo de imobilização, além das questões econômicas, devem ser consideradas as questões operacionais, como as condições experimentais empregadas na síntese, à facilidade de produção, o tempo envolvido no processo e quantidade de enzima incorporada. Dentre os diferentes métodos destaca-se a imobilização em matrizes obtidas pela técnica sol-gel (Pinheiro *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2013).

O processo para formação da matriz hidrofóbica para imobilização possui diversas variáveis que determinam as características finais dos materiais, tais como o grupo silanol precursor da sílica (TEOS, TMOS), o tipo de catalisador utilizado na síntese do material (HCl, HBr, HF, NH_4OH), o tempo de hidrólise e condensação e a homogeneidade do produto. Além disso, alguns aditivos químicos (polietilenoglicol (PEG), polivinilálcool (PVA), líquidos iônicos e albumina) podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita sua utilização para imobilizar enzimas (Reetz *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2006).

Neste contexto, para a imobilização da lipase neste trabalho, optou-se pelo emprego do método sol-gel, particularmente pela sua simplicidade, onde a enzima a ser imobilizada é adicionada *in situ* durante a formação da matriz, proporcionando a incorporação total da enzima oferecida ao suporte, além de o processo ocorrer em condições brandas de temperatura (ambiente) e em uma ampla região de pH. O objetivo do trabalho foi imobilizar a enzima *Candida antarctica* B (CALB) pela técnica sol-gel, com o uso de três diferentes iniciadores da reação de polimerização: ácido (HCl), básico (HBr) e nucleofílico (NH_4OH) e estudar a estabilidade de armazenamento e operacional do xerogel imobilizado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Imobilização com o uso de diferentes iniciadores da reação de polimerização

A lipase de *Candida antarctica* B foi imobilizada em xerogel obtida pela técnica de sol-gel segundo metodologia descrita por. Inicialmente, 5 mL de TEOS foram dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,6 mL de água destilada e três gotas do iniciador da reação de polimerização. Foram testados três diferentes iniciadores da polimerização: ácido (HCl), básico (NH_4OH) e nucleofílico (HBr). Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a uma etapa de agitação, em agitador orbital (shaker) a 40 °C, 180 rpm, por um período de 90 min. Passado este período, fez-se a adição de 1 mL da solução enzimática (160 mg mL^{-1}). Para cada condição, paralelamente foi conduzido um ensaio adicionando, após a enzima, 1 mL de uma solução do aditivo PEG 1500 na concentração de 5 mg mL^{-1} . Nas bateladas conduzidas com os iniciadores ácido e nucleofílico foram adicionados 1,75 mL da solução hidrolisante (solução etanólica de hidróxido de amônio 1,0 mol L^{-1}). Posteriormente, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas, em temperatura ambiente (20-25 °C), por 24 h para completar a condensação química. Após as 24 h, o suporte foi colocado em dessecador a vácuo (temperatura ambiente) por um novo período de 24 h para completar a secagem por evaporação. Devido ao uso de diferentes iniciadores da reação de polimerização, os xerogéis imobilizados foram denominados de ácido, básico e nucleofílico.

2.2 Determinação 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 μ L 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.

2.3 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento de imobilização nos xerogéis foi calculado pela porcentagem da razão entre a atividade total de esterificação do xerogel sintetizado e a atividade de esterificação total vinculada a na massa de enzima livre adicionada na etapa de imobilização.

2.4 Estabilidade de estocagem e operacional

A estabilidade de estocagem dos xerogéis e da enzima livre foi realizada em temperatura entre 20-25 °C e em refrigeração entre 3-5 °C. A atividade foi acompanhada semanalmente, por um período de 200 dias. A estabilidade operacional dos xerogéis, com e sem o uso de PEG, foi determinada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com a reutilização dos xerogéis imobilizados. Neste estudo, empregou-se em todas as bateladas a mesma massa de xerogel imobilizado (0,1 g). Após cada batelada, o meio reacional (fase líquida) foi removido com o auxílio de uma pipeta, mantendo a fase sólida (xerogel imobilizado).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da atividade de esterificação e do rendimento da imobilização

A Tabela 1 apresenta a massa de enzima, a atividade de esterificação teórica adicionada na imobilização, a massa do xerogel obtido, a atividade do xerogel por grama, a atividade de esterificação total do xerogel e os rendimentos de imobilização nos xerogéis obtidos empregando os diferentes iniciadores da reação de polimerização (ácido, básico e nucleofílico), com e sem o uso do PEG 1500.

Tabela 1 - Rendimento da imobilização da enzima CALB em xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do PEG

Xerogel	Enzima Adicionada		Enzima imobilizada			
	ME (g)	AA (U)	m (g)	AE (U)	AT (U)	R (%)
Ácido	1	779,2	2,16	197,5	425,6	54,6
Ácido com PEG	1	779,2	2,54	209,8	532,8	68,4
Básico	1	779,2	1,17	177,0	207,1	26,6
Básico com PEG	1	779,2	1,48	378,7	560,6	71,9
Nucleofílico	1	779,2	2,03	148,4	301,4	38,7
Nucleofílico com PEG	1	779,2	2,76	260,6	719,4	92,3

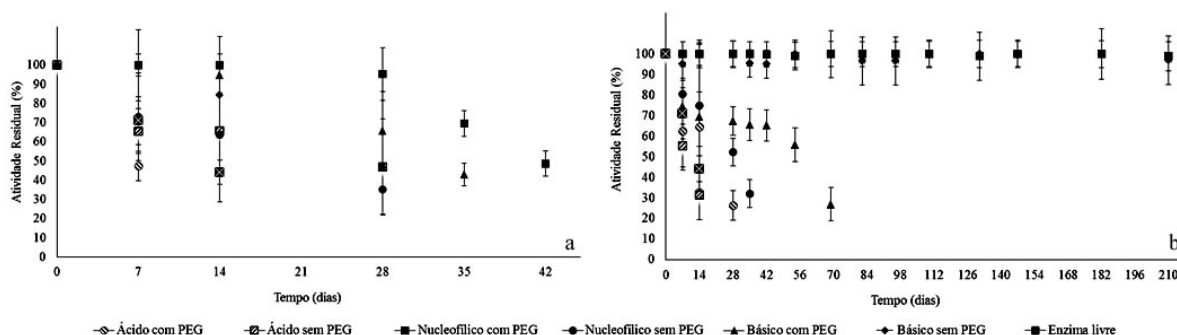
ME: massa de enzima; AA: atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização; m: massa do xerogel; AE: atividade de esterificação por grama do xerogel; AT: atividade total no xerogel; R: rendimento do xerogel.

De acordo com a Tabela 1, todos os ensaios apresentaram um aumento na massa do xerogel e na atividade de esterificação com a adição do PEG e, conseqüentemente, no rendimento e na atividade total obtida. Dentre os ensaios, a maior atividade de esterificação, com 719,4 U e 92% de rendimento, foi observada para o xerogel nucleofílico sintetizado na presença do PEG. Esta tendência observada foi vinculada ao efeito estabilizante do aditivo (Soares *et al.*, 2002).

3.2 Estabilidade de estocagem

A Figura 1 descreve o comportamento da atividade de esterificação residual para os xerogéis ácido, básico e nucleofílico, com e sem a adição do PEG, armazenados a temperatura ambiente (a) e refrigeração (b).

Figura 1 - Atividade de esterificação residual no armazenamento do xerogel imobilizado



No que se refere ao armazenamento em temperatura ambiente (Figura 1 a), independe da presença ou não do PEG, os xerogéis básicos e nucleofílicos apresentaram atividades residuais superiores aos xerogéis ácidos. Considerando o mesmo derivado, observam-se tendências distintas em função da presença ou não do PEG. Os xerogéis preparados com iniciadores da reação de polimerização ácido e básico apresentaram maiores tempos de armazenagem com atividade residual $\geq 50\%$ da inicial para as amostras sintetizadas sem o PEG, sendo que destes a maior diferença, de 7 para 28 dias, ou seja, um aumento de aproximadamente 300% observada para o meio ácido. Tendência contrária foi observada para os xerogéis nucleofílicos. Para este derivado, os sintetizados na presença do PEG, com 42 dias, foram os que apresentaram o maior tempo de armazenagem com atividade residual $\geq 50\%$. A enzima livre teve um tempo de armazenagem de 14 dias, ou seja, menor que a maioria dos derivados testados.

Ao serem armazenados em refrigeração (Figura 1 b), os xerogéis básicos e nucleofílicos apresentaram tendências similares às obtidas quando do armazenamento em temperatura ambiente: apresentaram maiores tempos de estocagem em relação aos xerogéis ácidos. Dentre os xerogéis, o básico sem PEG e o nucleofílico com PEG, com atividades residuais de aproximadamente 100% em 203 dias de armazenamento, foram os que apresentaram os melhores resultados. Para os xerogéis básicos e nucleofílicos observam-se tendências distintas em função do uso do PEG. Nos xerogéis básicos a ausência do PEG proporcionou um aumento de 500% no tempo com atividade residual $\geq 50\%$ da inicial, em relação ao xerogel contendo PEG. Para os xerogéis nucleofílicos, o com PEG foi o que apresentou os maiores

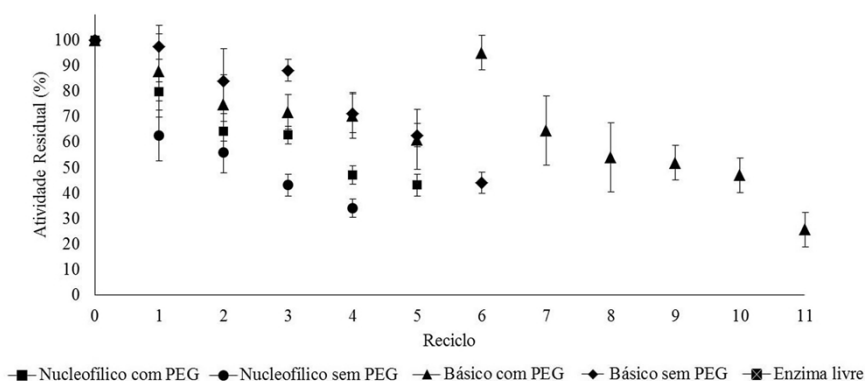
tempos de armazenagem. Os derivados ácidos, com tempos com atividade residual \geq a 50% da inicial de 7 (sem PEG) e 14 dias (com PEG) foram os que apresentaram os resultados menos promissores e, conseqüentemente, optou-se por não testá-lo no decorrer do trabalho.

A estabilidade de estocagem por longos períodos é um dos principais fatores a ser considerado quando se utiliza lipases imobilizadas. Neste contexto, com uma atividade residual de aproximadamente 100% por 203 dias, o xerogel básico sem PEG e nucleofílico com PEG se destacam em relação aos resultados observados na literatura (Soares *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011).

3.3 Estabilidade operacional

A possibilidade de reutilizar a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada foi determinada empregando como modelo a reação de esterificação do oleato de etila. O comportamento das atividades residuais, tendo como referência a atividade referente à primeira reação, é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Atividade de esterificação residual da estabilidade operacional



Considerando uma atividade residual \geq a 50% da atividade inicial, os xerogéis (independentemente do iniciador de reação empregado) sintetizados na presença do PEG foram os que apresentaram os melhores resultados. Destes, destaca-se o xerogel básico, com nove reusos. Resultados similares são observados na literatura para imobilizado em suportes obtidos via sol-gel (Yilmaz *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013).

3. CONCLUSÕES

O processo de imobilização proporcionou um aumento da estabilidade de estocagem e operacional em relação à enzima livre. Num contexto geral, dentre os xerogéis imobilizados os que apresentaram os melhores resultados foram os básicos, com e sem PEG, e nucleofílico com PEG. A temperatura de estocagem demonstrou ser uma das principais variáveis a ser considerada no processo, com os xerogéis estocados em refrigeração apresentando resultados melhores, em termos de atividade residual, em relação às amostras estocadas a temperatura ambiente. Em relação à estabilidade operacional os resultados demonstraram a possível reutilização dos xerogéis imobilizados, comprovando a eficiência da metodologia empregada, sendo esta uma das principais vantagens sobre a enzima livre.

4. REFERÊNCIAS

- 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.
- FICANHA, A. M. M. *Imobilização de lipase de Candida antarctica B (CAL B) pela técnica de sol-gel*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim, 2014.
- PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F. DE; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Influence of gelation time on the morphological and physico-chemical properties of the sol gel entrapped lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 146, p. 203. 2008,
- 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.
- SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 42, p. 1. 2006.
- 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.; 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.; 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 Microb. Technol.*, v. 52, p. 141. 2013.
- WANG, Y.; HSIEH, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J. Membr. Sci.*, v. 309, p. 73. 2008.
- YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 69, p. 35, 2011.