

## ESTUDO DO PROCESSO DE RECICLOS EM BATELADA UTILIZANDO DIFERENTES COMPOSTOS ORGÂNICOS DA LIPASE B DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM ESPUMA FLEXÍVEL DE PU DE DENSIDADE 30 E 18

ANTUNES, A.<sup>1</sup>, FICANHA, A. M. M.<sup>1</sup>, NYARI, N.L.D.<sup>1</sup>, ZAMADEI, R.<sup>1</sup>, M. BOPSIN<sup>1</sup>, K. L. LEVANDOSKI<sup>1</sup>, A. R. PAULAZZI<sup>1</sup>, ZENI, J.<sup>1</sup>, DALLAGO, R.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Departamento de Engenharia de Alimentos, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil  
[nenantunes@gmail.com](mailto:nenantunes@gmail.com)

RESUMO – Enzimas são biocatalisadores com ampla aplicação em diversos tipos de reações, porém, o custo elevado das enzimas solúveis é um dos limitadores de sua aplicação, pois são descartadas após a reação e seu uso se torna economicamente inviável. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade operacional da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) imobilizada em poliuretano flexível de densidades 30 e 18. O processo de imobilização se deu com a mistura de uma solução enzimática mais, monômeros, surfactantes, extensores de cadeia e água. Devido à falta de uma metodologia definida na literatura, a estabilidade operacional do reuso foi realizada por lavagens com diferentes solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol e solução padrão) com ciclos de reuso de 24 horas. Os resultados demonstram a possibilidade de reuso dos derivados, sendo que para todos os solventes utilizados o número de ciclos foi de 15 com atividade residual superior a 50%, tanto para o derivado de densidade 30 quanto para o de densidade 18.

### 1 INTRODUÇÃO

A enzima lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) é um excelente catalisador para vários tipos de reações, dentre elas, a esterificação. Um dos principais problemas em utilizar enzimas livres em meios orgânicos é por serem solúveis, flexíveis, com estrutura catalítica ordenada, delicada e frágil. Para isso é necessário utilizá-la na forma imobilizada, pois aumentam o número de moléculas por unidade de área e, conseqüentemente há um aumento das propriedades cinéticas e da eficiência das reações (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Ozyilmaz e Gezer, 2010). Neste sentido, o uso de técnicas que possibilitem a estabilidade operacional é desejável na produção de biocatalisadores para aplicações industriais, tais como, a imobilização de enzimas.

Desta forma, observa-se um crescente aumento na utilização da técnica de imobilização de enzimas dentro do campo da biotecnologia aplicada. As enzimas imobilizadas aumentam o número de moléculas por unidade de área e, conseqüentemente, a eficiência da reação. Além disso, as vantagens incluem também a reutilização da enzima, permitindo o seu uso contínuo; o aumento das propriedades cinéticas que melhora o controle do processo catalítico; e o aumento da estabilidade (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi testar o reuso da enzima lipase comercial de *Candida antarctica* B imobilizada em situ em espuma flexível de PU em diferentes densidades, na síntese de oleato de etila.

## 2 MATÉRIAS E MÉTODOS

A enzima utilizada foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) e as proporções dos monômeros, surfactantes, extensores de cadeia e água para as diferentes densidade de estudos foram cedidas pela Tasca Estofados e Cia (empresa fabricante de espuma flexíveis de poliuretano). Para o imobilizado D30 utilizou-se as proporções dos monômeros (68,85%), surfactantes (0,6%), extensores de cadeia (28,47%) e água (1,95%), para o imobilizado D20 as proporções dos monômeros foram (57,35%), surfactantes (0,76%), extensores de cadeia (37,55%) e água (2,86%) e para o imobilizado D18 as proporções dos monômeros (58,71%), surfactantes (0,98%), extensores de cadeia (37,98%) e água (2,35%) (Figura 11), para as porcentagens dos componentes do PU deve-se levar em consideração a volatilidade dos mesmo. Os solventes utilizados foram hexano (Quimex 97% de pureza), metanol (Quimex 97% de pureza) e etanol (Quimex 97% de pureza).

### 2.1 Imobilização

O procedimento experimental para imobilização da *Candida antarctica* B (CALB) em espuma flexível de PU se deu com o emprego da enzima em estado líquido, com preparo de solução enzimática (2 g em 20 mL de água destilada). O imobilizado foi produzido pela mistura da enzima em solução (correspondendo a 10 % do volume total dos monômeros). O processo de preparo para imobilização da CALB em espuma flexível de PU inicia com a mistura dos monômeros (poliol e copolímero) em um béquer, os quais são homogeneizados por 15 segundos. Em seguida é adicionada a essa mistura a solução enzimática a qual também se faz a homogeneização. Após é incorporado a mistura do béquer, a ASA (amina, silicone e água), em concomitante é feita a adição do estanho, e por fim é vertido ao béquer o isocianato o qual dá o início do processo de polimerização. A mistura de todos os compostos que fazem parte do PU é vertida para um recipiente retangular de alumínio (recipiente que dará forma ao polímero) previamente untada com vaselina sólida. Para ambas as densidades o procedimento de imobilização foi o mesmo.

Após aproximadamente 1 minuto ocorreu a expansão da espuma e a completa polimerização da mesma, possibilitando visualizar algumas características da espuma formada, como conformação, flexibilidade, maciez, firmeza, porosidade interna e resistência (Lucas *et al.*, 2001; Santos, 2011). Cabe ressaltar que o método de imobilização utilizado nesta pesquisa consiste no método de encapsulamento, onde ocorre a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, realizando o “confinamento” da proteína no polímero insolúvel, resultando no biocatalisador imobilizado (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Gonçalves, 2007).

### 2.2 Atividade Enzimática- Esterificação

A atividade de esterificação foi realizada pela quantificação da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1 (v/v)). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição da enzima (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro

com tampa, mantidos em agitador orbital. Aliquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração de éster de oleato de etila segundo Paroul *et al.* (2010 e 2011). A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada baseando em Brígida *et al.*, 2010).

### 2.3 Determinação do Rendimento

O rendimento do imobilizado foi calculado pela porcentagem da razão da atividade total da enzima livre em solução utilizado na imobilização e da atividade total do imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido (Brígida *et al.*, 2010).

### 2.4 Estabilidade operacional

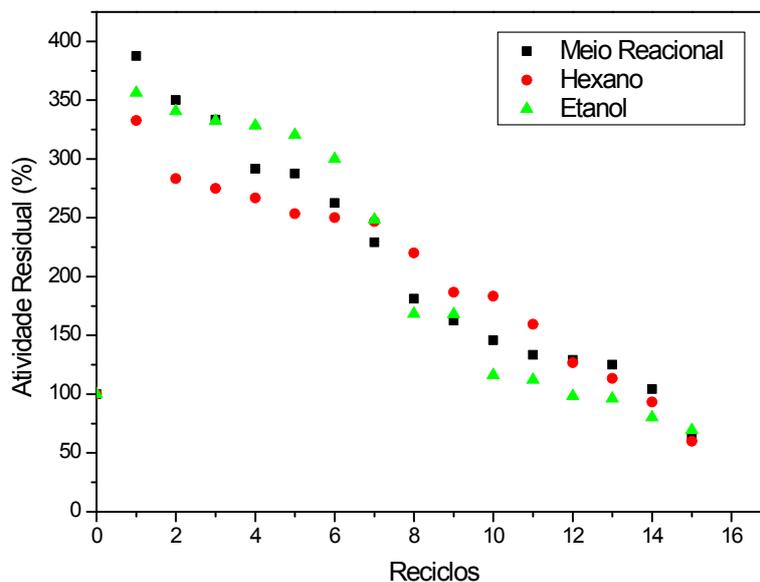
A estabilidade operacional foi realizada em batelada de 24 horas, tanto para espuma de densidade 30 como para a de densidade 18. Este procedimento foi realizado no final de cada ciclo de reação, no qual, o produto (fase líquida) foi removido com uma pipeta e foi mantida a fase sólida (derivado imobilizado). As reações foram repetidas até o derivado chegar a uma atividade de esterificação residual maior ou igual a 50 % da atividade inicial.

Depois de transcorrido o tempo das reações de síntese (40 minutos de reação), o meio reacional foi removido de cada um dos sistemas, após a remoção do meio reacional, o derivado imobilizado foi submetido a uma etapa de lavagem com os diferentes solventes, sendo eles, hexano, metanol, etanol (1 vez com 5 mL de cada um dos solventes), o mesmo procedimento foi avaliado para a solução padrão de síntese (ácido oleico:etanol). Após, o meio foi centrifugado a 5000 rpm. Retiram-se os solventes sobrenadantes, deixou-se o derivado em estufa a 40 °C por aproximadamente 24 horas para a evaporação do solvente residual, com exceção ao frasco reacional do imobilizado da solução padrão. Posteriormente, as mesmas quantidades de solução padrão foram adicionadas ao derivado para a próxima reação.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos da imobilização, este fato é importante para as enzimas lipase devido ao seu preço, visto que, o custo da enzima é um dos principais problemas quando se refere a sua aplicação industrial. A possibilidade de reutilizar a lipase CALB imobilizada foi determinada por reações de síntese de oleato de etila, apresentados nas Figuras 1 e 2 respectivamente.

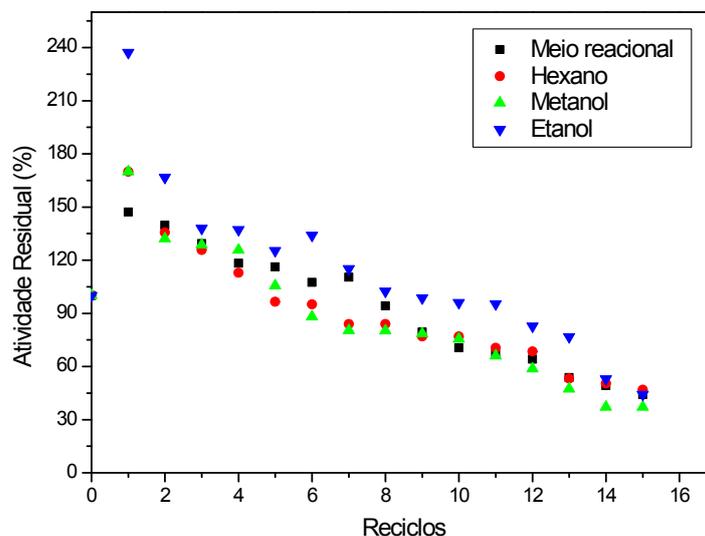
Figura 1 - Número de ciclos da lipase imobilizada em PU de densidade 30 com lavagens em diferentes solventes



Considerou-se para o reciclo, atividade residual maior ou igual a 50 % do valor da atividade inicial I. Na Figura 1 (poliuretano densidade 30), os 3 solventes, hexano, etanol e solução padrão apresentaram um número de reuso igual a 15 quando o imobilizado atingiu a porcentagem de critério de avaliação, e optou-se por parar o processo de reciclos devido a perda considerável de massa do imobilizado. O metanol não foi eficiente no processo de secagem, pois, após 24 horas em estufa ainda observa-se solvente no frasco de reação, e por não saber qual seria a influencia do solvente na atividade de esterificação, optou-se por não utiliza-lo nesse estudo.

No decorrer do estudo dos reciclos com lavagem, verificou-se perda de massa significativa dos imobilizados, portanto, optou-se por parar esse estudo quando os mesmo atingiram 15 ciclos, fazendo com que a atividade residual caísse bruscamente.

Figura 2 - Número de reciclos da lipase imobilizada em PU de densidade 18 com lavagens em diferentes solventes



A Figura 2 (poliuretano densidade 18) apresenta a mesma tendência observada para todos os solventes, dos quais um é o próprio meio reacional, sugere-se então, não ser o processo de lavagem o fator determinante para o aumento da atividade residual após o primeiro ciclo, mas sim o período de tempo entre ciclos e a secagem do suporte o que poderia estar influenciando nesse processo. Estes resultados podem ser considerados bons, pois a enzima imobilizada poderá ser utilizada em ciclo batelada por várias vezes, o que para a indústria se torna vantajoso, em relação ao custo da utilização de enzimas imobilizadas. Cabe ressaltar que o suporte onde a enzima está imobilizada não degrada, quando utilizado em reações com solventes orgânicos.

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária à enzima. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (Martins, 2012; Martins *et al.*, 2014).

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho são bastante satisfatórios, pois a CALB imobilizada em poliuretano de diferentes densidades (30 e 18) pode ser utilizada por até 15 ciclos de reuso batelada, em meio reacional com presença de solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol e solução padrão), sem que o suporte seja degradado.

## 5 REFERÊNCIAS

BITENCOURT, C. C.; PEREIRA, E. B. Síntese de ésteres formadores de aromas empregando lipases imobilizadas em quitosana por adsorção física. *Rev. Inic. Cientif.*, v. 4, 2009.

- BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydr. Polym.*, v. 79, p. 832-838, 2010.
- DALLA VECCHIA, C.; BOWER, R. G.; THEUNS, T.; BALOGH, M. L.; MAZZOTTA, P., FRENK, C. S. Quenching cluster cooling flows with recurrent hot plasma bubbles. *Month. Not. Roy. Astron. Soc.*, v. 355, p. 995-1004, 2004.
- GONÇALVES, F. A. G. *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Belo Horizonte, Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais. 2007
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C., *Caracterização de Polímeros, Determinação de peso molecular e análise térmica*. E-papers. Rio de Janeiro, 2001.
- MARTINS, A. B. *Comparação entre agitação mecânica e ultrassônica na Síntese de ésteres de aromas catalisada por lipase*. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- MARTINS, A. B.; DA SILVA, A. M.; SCHEIN, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; ZÁCHIA AYUB, M. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 105, p. 18-25, 2014.
- OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 64, p. 140-145, 2010.
- PAROUL, N.; BIASI, A.; ROVANI, A. C.; PRIGOL, C.; DALLAGO, R.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free system. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 33, p. 583-589, 2010.
- PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Solvent-free geranylolate production by enzymatic esterification. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 34, p. 323-329, 2011.
- PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. *Chem. Biochem. Eng.*, v. 33, p. 148-158, 2007.
- SANTOS, R. D. *Produção Enzimática de Poli (ε-Caprolactona) em Dióxido de Carbono Supercrítico*. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2011.
- VALDEZ-PEÑA, A. U.; ESPINOZA-PEÑA, J. D.; BALAGURUSAMY, N.; SANDOVAL-FABIAN, G. C.; HERNANDEZ-RIBERA, A.; DE-LA-GARZA-RODRIGUEZ, N. D.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Sci. Technol.* v. 19, p. 553-557, 2010.