

# AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DE LIPASE MICROBIANA IMOBILIZADA EM COPOLÍMERO DE ESTIRENO E DIVINILBENZENOMAGNETIZADO

C. F. Do PRADO<sup>1</sup>, H. B. S. BENTO<sup>1</sup>, P. C. OLIVEIRA<sup>1</sup>, H. F. De CASTRO<sup>1</sup>, L. FREITAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: [cintia@alunos.eel.usp.br](mailto:cintia@alunos.eel.usp.br)

**RESUMO** - A imobilização de lipases em matrizes híbridas visando à obtenção de biocatalisadores ativos, estáveis e de baixo custo, vem se destacando como uma alternativa para o desenvolvimento sustentável, de química verde ou de tecnologia limpa. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte de copolímero de estireno-divinilbenzeno magnetizado pela inserção de partículas de óxido de ferro, visando a substituição dos tradicionais catalisadores químicos e possível aplicação industrial. Para tanto, o desempenho do biocatalisador magnetizado foi comparado com a lipase livre e imobilizada em suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) não magnetizado, sendo caracterizados em função das melhores condições de operação em pH e temperatura, determinação das constantes cinéticas e estabilidade térmica. Os resultados sugeriram que o derivado magnetizado possui grande potencial de aplicação, apresentando  $K_m$  de 1766,57 mM,  $V_{máx}$  de 5870,08 U g<sup>-1</sup>, elevada estabilidade térmica ( $K_d = 0,068$  h<sup>-1</sup>) e tempo de meia vida de 10,2h, comprovando assim a boa estabilidade do biocatalisador. Além disso, a incorporação de partículas magnéticas facilita sua separação do meio e possibilita sua reutilização de modo eficiente.

## 1. INTRODUÇÃO

As exigências para que as indústrias operem seus processos em condições de desenvolvimento sustentável, são cada vez mais importantes em várias partes do mundo, e tornam-se um obstáculo a ser superado sem a disponibilidade de biocatalisadores adaptados a estas condições (Polshettiwar *et al.*, 2011; Verma; Barrow; Puri, 2013). Assim, o uso de processos enzimáticos em substituição às rotas químicas tradicionais desponta como uma alternativa para a obtenção de produtos não agressivos do ponto de vista ecológico.

Nesse contexto, a imobilização de lipases em suportes sólidos torna essa área ainda mais promissora, atribuindo maior estabilidade ao biocatalisador, permitindo operações em regime contínuo, melhor dispersão no meio reacional e sobretudo, a capacidade de reutilização (Paula *et al.*, 2008). Dentre os métodos de imobilização mais usados atualmente estão: a ligação cruzada; a encapsulação; as ligações covalentes e a adsorção, sendo essa última a mais simples e comumente aplicada (Lima *et al.*, 2001).

Atualmente os materiais híbridos magnetizados vêm sendo muito utilizados como matrizes de imobilização, devido a facilidade de recuperação do biocatalisador por separação magnética (Lee *et al.*, 2003), otimizando o processo. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase de *Candida rugosa* em um suporte de copolímero de estireno e divinilbenzeno magnetizado com partículas de óxido de ferro e caracterizar o biocatalisador obtido quanto às suas propriedades bioquímicas e cinéticas, visando futuras aplicações.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Foi usada a lipase microbiana de *Candida rugosa* (tipo VII, Sigma-Aldrich®) na forma livre e imobilizada através de adsorção física em copolímero de estireno-divinilbenzeno magnetizado (STY-DVB-M) e não magnetizado (STY-DVB). Para a imobilização e realização das dosagens de atividade enzimática foram utilizados os seguintes materiais de partida: n-heptano (Cromoline), polietilenoglicol - PEG (Synth – MM 1500), azeite de oliva comercial com baixo teor ácido (Carbonell) e goma arábica em pó pura (Synth).

### 2.2. Síntese dos suportes poliméricos (STY-DVB e STY-DVB-M)

Os suportes de STY-DVB foram sintetizados através da técnica de polimerização em suspensão utilizada por Oliveira *et al.* (2000), tendo o suporte STY-DVB-M recebido a adição de 10% (m/m) de magnetita obtida pelo método de co-precipitação dos íons  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  em meio básico, tratada com ácido oleico segundo a metodologia descrita por Lee *et al.* (2003). As partículas obtidas foram peneiradas e as retidas entre as peneiras de 24 e 35 Mesh (Tyler) foram escolhidas para a realização da imobilização.

### 2.3. Imobilização de lipase *Candida rugosa* nos suportes poliméricos

A imobilização foi realizada através de adsorção física, em uma proporção de 0,25g de enzima para 1g de suporte com adição de 100  $\mu\text{l}$  de polietilenoglicol por grama de suporte. O sistema permaneceu conservado por 24 h a 4°C e o biocatalisador foi recuperado por filtração à vácuo seguido de lavagens com heptano até umidade inferior a 15% (Oliveira *et al.*, 2000).

### 2.4. Dosagem da atividade hidrolítica

O método da hidrólise de azeite de oliva de Soares *et al.* (1999) foi utilizado para a dosagem da atividade hidrolítica dos suportes imobilizados (STY-DVB e STY-DVB-M) e da enzima livre. O rendimento de imobilização ( $\eta\%$ ) foi calculado pela relação de unidades de atividade fornecida para imobilização e a quantidade recuperada pelo imobilizado.

### 2.5. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas

Para a determinação da cinética das reações de hidrólise foram utilizadas concentrações variáveis de substrato - 10 a 50% (m/v) de azeite de oliva em relação à solução aquosa de goma arábica (7% m/v). O software Hyper 32 foi utilizado para calcular os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\text{áx}}$ ). As propriedades bioquímicas, como influência do pH e da

temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* (LCR) livre e dos derivados imobilizados, foram avaliadas por um planejamento estatístico  $2^2$  estrela rotacional com quatro replicatas no ponto central (45 °C e pH = 7). Os níveis reais e codificados das variáveis em estudo estão apresentados na Tabela 1, sendo os resultados analisados pelos softwares Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 9.0 (Stat-Ease Corporation, USA).

Tabela 1 – Níveis utilizados no planejamento estatístico

	Alfa(-)	Nível baixo	Ponto central	Nível alto	Alfa(+)
Temperatura (°C)	31	35	45	55	59
pH	5,6	6,0	7,0	8,0	8,4

## 2.6. Estabilidade térmica

A enzima livre e os derivados imobilizados foram incubados em meio de heptano a 60°C em intervalos de tempo entre 15 e 180 min. Amostras foram retiradas e suas atividades residuais medidas, tomando-se o valor obtido no tempo zero como 100%. As Equações (1) e (2) forneceram o coeficiente de desativação (kd) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), em que  $A_0$  = atividade inicial e A = atividade residual.

$$\ln A = \ln A_0 - kd \times t \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{kd} \quad (2)$$

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Atividades hidrolíticas e rendimento de imobilização

As atividades hidrolíticas e os rendimentos de imobilização obtidos para os biocatalisadores testados encontram-se na Tabela 2. Os elevados valores das atividades hidrolíticas e de rendimento de imobilização indicam a eficiência do processo de imobilização e o efetivo potencial de aplicação do suporte STY-DVB-M, visto que a lipase imobilizada neste suporte apresentou os maiores valores para esses dois parâmetros. Este fato pode ser explicado pela menor perda de massa durante o processo de imobilização devido a fácil recuperação deste biocatalisador através da aplicação de um campo magnético externo.

Tabela 2 – Atividade hidrolítica e Rendimento de imobilização dos biocatalisadores

Lipase de <i>Candida rugosa</i> *	Rendimento de Imobilização (η%)	Atividade (U g <sup>-1</sup> )
Imobilizada em STY-DVB	69	1292 ± 66
Imobilizada em STY-DVB-M	89	1456 ± 71

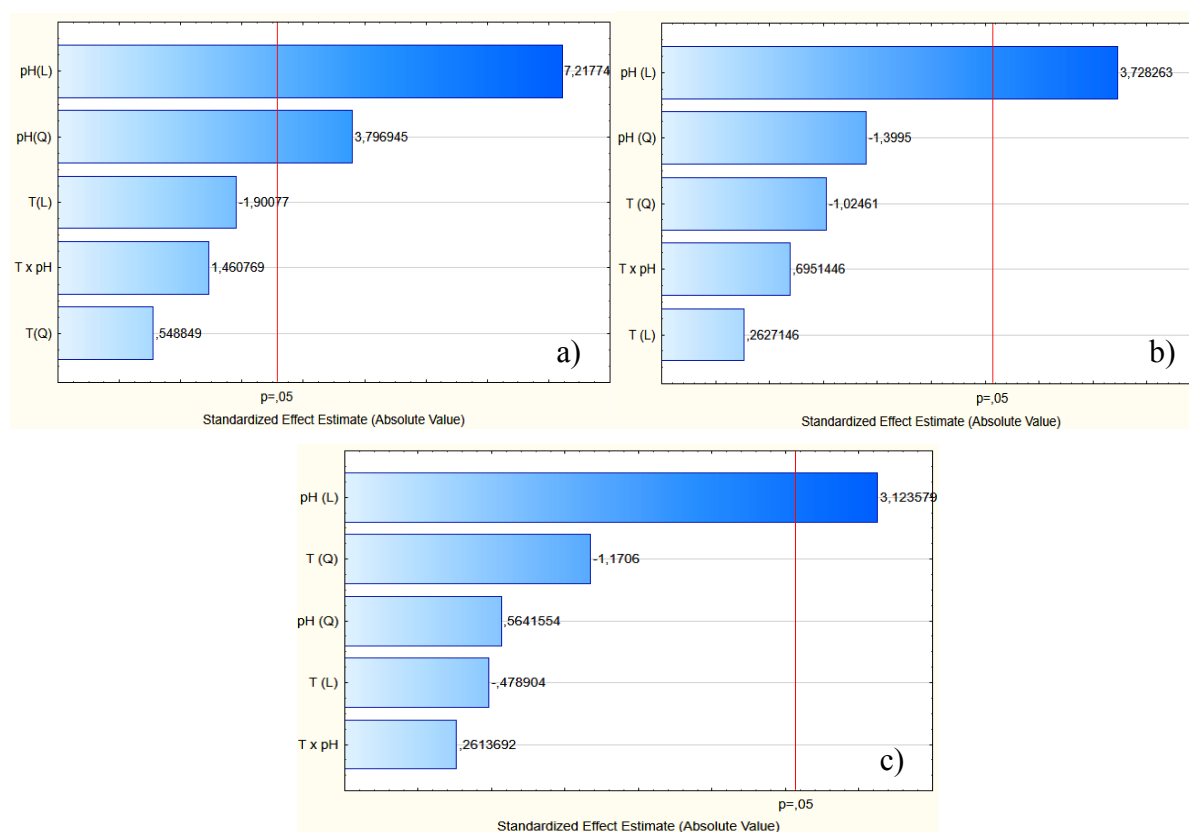
\* No processo de imobilização foram fornecidas 2000 U de lipase livre por grama de suporte

### 3.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Um planejamento estatístico  $2^2$  estrela rotacional foi realizado para obter as condições ótimas de pH e temperatura para os biocatalisadores testados. A variação nos valores de

atividade hidrolítica foi de 10597 a 18003 U·g<sup>-1</sup> para a lipase livre, de 2232 a 2771 U·g<sup>-1</sup> para a lipase imobilizada no suporte STY-DVB e de 1683 a 2908 U·g<sup>-1</sup> para a lipase imobilizada no suporte STY-DVB-M. Nota-se que a enzima livre apresentou maior variação em sua atividade, em comparação aos derivados imobilizados, demonstrando que a imobilização gerou maior estabilidade, mantendo os níveis de atividade sob condições mais amplas. A Figura 1 (a-c) trás os gráficos de Pareto da análise estatística dos efeitos (t calculado em relação a t tabelado, com 95% de confiança) relacionados à influência de pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada nos suportes. A partir da análise da Figura 1a pode-se prever o comportamento da lipase livre, sendo que o aumento do pH gera uma influência positiva na atividade hidrolítica (tanto o efeito linear como o quadrático), enquanto que a relação com a temperatura não é determinante.

Figura 1 – Gráficos de Pareto para a) LCR livre, b) STY-DVB e c) STY-DVB-M



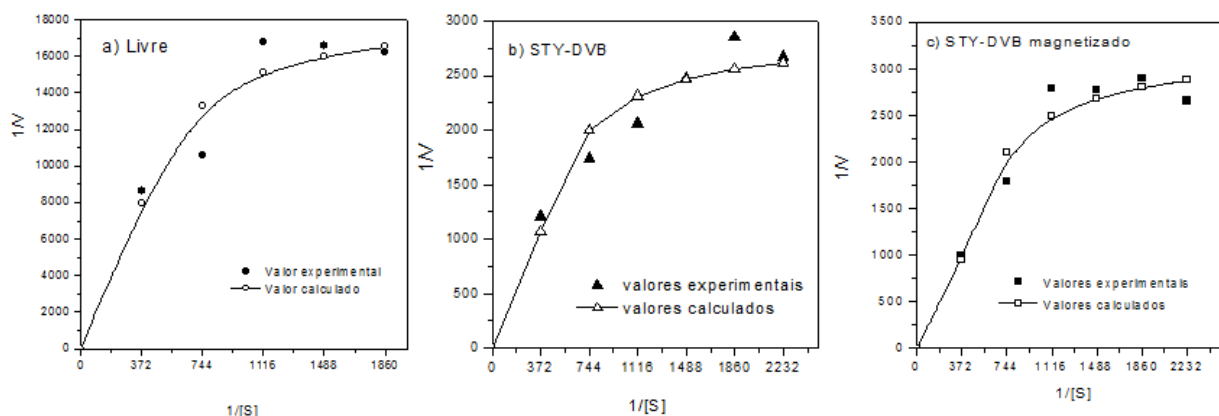
Observando-se as Figuras 1b e 1c, percebe-se a mesma tendência observada para a enzima livre, ou seja, na referida faixa de temperatura não houve significativa alteração no processo de hidrólise. Apenas a mudança de pH acarretou uma variação considerável, sendo que quanto maior a basicidade do meio, maior a atividade hidrolítica. O ponto ótimo para o pH foi próximo a 8, valor que corrobora com resultados anteriores de caracterização desta mesma lipase que apontaram uma faixa de pH ótimo entre 7 e 8 (Paula *et al.*, 2008).

### 3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

O perfil das atividades hidrolíticas realizadas a 45°C e pH = 8 para os três sistemas testados está representado graficamente na Figura 2 (a-c). Os parâmetros cinéticos foram

determinados a partir desses resultados, considerando a cinética de Michaelis-Menten e empregando o software Hyper 32 para ajuste dos dados experimentais.

Figura 2 – Perfil de atividades hidrolíticas ( $U \cdot g^{-1}$ )  $\times$  concentração ( $mmol \cdot L^{-1}$ ).



Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados pela Equação 3 e mostrados na Tabela 3.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Tabela 3 - Valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para os tr\^es sistemas avaliados

Sistema	$V_{m\acute{a}x} (U \cdot g^{-1})$	$K_m (mM)$
LCR Livre	22576	626
LCR imobilizada em STY-DVB	3699	781
LCR imobilizada em STY-DVB-M	5870	1767

O maior valor de  $K_m$  verificado pelo derivado imobilizado magnetizado indica redu\c7\~ao da afinidade da lipase pelo substrato. Esse fato pode ser justificado pela incorpora\c7\~ao das nanopart\^iculas de \^oxido de ferro no suporte h\^ibrido, sugerindo limita\c7\~ao difusional do substrato ao s\^ito ativo da enzima, devido \^a presen\c7a da magnetita.

### 3.4. Estabilidade t\^ermica

A Tabela 4 mostra os par\^ametros de de desativa\c7\~ao t\^ermica ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para a enzima livre e derivados imobilizados incubados a  $60^\circ C$ . O decaimento de atividade hidrol\^itica da LCR livre ap\^os 15 minutos de incubaq\~ao foi significativo, enquanto os derivados imobilizados demonstraram maior estabilidade t\^ermica. O maior tempo de meia vida foi encontrado para o derivado magnetizado (cerca de 10h), indicando a forma\c7\~ao de liga\c7\~oes est\^aveis entre a enzima e o suporte magn\^etico no processo de imobiliza\c7\~ao, melhorando assim a estabilidade t\^ermica desse biocatalisador quando comparado ao imobilizado n\~ao magn\^etico. Al\^em disso, o tempo de meia vida obtido para LCR imobilizada em STY-DVB-M foi superior ao obtido em trabalho realizado por Sim\^oes *et al.* (2011), que imobilizou essa mesma lipase em uma matriz de  $SiO_2$ -quitosana ( $t_{1/2} = 1,63$  h).

Tabela 4- Constante de desativação térmica e tempo de meia vida dos biocatalisadores

Sistema	kd (h <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
LCR Livre	3,46	0,2
LCR imobilizada em STY-DVB	0,10	6,8
LCR imobilizada em STY-DVB-M	0,07	10,2

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam grande potencial de aplicação do biocatalisador magnético, uma vez que a incorporação de partículas magnéticas não prejudicou sua atuação catalítica, além de contribuir para o aumento do rendimento de imobilização e facilitar a sua separação e recuperação do meio reacional a partir da utilização de um campo magnético externo. Constatou-se que o biocatalisador magnético possui pH ótimo próximo a 8 e atuação catalítica estável em uma ampla faixa de temperatura. Além disso, este derivado imobilizado revelou um elevado tempo de meia-vida (10,2 h), mostrando que a imobilização estabilizou termicamente a lipase de *Candida rugosa* no suporte de estireno-divinilbenzeno magnetizado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- LEE, Y.; RHO, J.; JUNG, B. Preparation of Magnetic Ion-Exchange Resins by the Suspension Polymerization of Styrene with Magnetite. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 89, p. 2058–2067, 2003.
- LIMA U.A.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.
- OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; De Castro, H.F.; Mei, L.H.I. Síntese do Butirato de n-Butila empregando Lipase Microbiana Imobilizada em Copolímero de Estireno-Divinilbenzeno. *Quim. Nova*, v. 23, p. 632–636, 2000.
- PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B. R.; BRAGA, L.P.; DE CASTRO, H.F.; BRUNO, L.M., Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Qui. Nova*, v. 31, p. 35-40, 2008.
- POLSHETTIWAR, V.; LUQUE, R.; FIHRI, A.; ZHU, H.; BOUHRARA, M.; BASSET, J.M. Magnetically Recoverable Nanocatalysts. *Chemical Reviews*, v. 111, p. 3036–3075, 2011.
- SIMÕES, A.S.; MORI, R.Y.; FARIA, R.; DE CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização de lipase microbiana de *Candida rugosa*. *Qui. Nova*, v. 34, São Paulo, 2011
- SOARES, C.M.F.; DE CASTRO, H.F.; MOARES, F.F.; ZANIN, G.M., Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 77, p. 745–757, 1999.
- VERMA, M.L.; BARROW, C.J.; PURI, M. Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 97, p. 23–39, 2013.