

EMPREGO DE SUPORTES DE BAIXO CUSTO PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* POR ADSORÇÃO FÍSICA: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

M. P. REINA¹, L. F. ALVES¹, A. J. SCHWANKE², A. B. NETO¹ e A. V. PAULA¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

² Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências Exatas e da Terra
E-mail para contato: marianapradoreina@gmail.com, ariela@fcfar.unesp.br

RESUMO – Para o uso de biocatalisadores em larga escala é interessante que eles possam ser reutilizados, sendo a imobilização em suportes sólidos uma importante ferramenta por torná-los insolúveis no meio reacional. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi determinar, dentre diferentes suportes, qual poderia conferir maior estabilidade térmica à lipase de *Rhizopus oryzae*, imobilizada por adsorção física. Os suportes utilizados foram Caulim e Diatomita (com e sem acidificação). Foram avaliadas as atividades hidrolítica e de esterificação, bem como o rendimento de imobilização. Quanto à atividade hidrolítica, destaca-se o derivado imobilizado em Caulim sem acidificação com atividade de 1561,61U/g. Quanto ao rendimento de imobilização, os maiores valores também foram obtidos empregando-se o suporte Caulim sem acidificação (25,68%). Na atividade de esterificação, o derivado de caulim acidificado resultou em mais elevados valores, 1827,99U/g. A partir destes resultados, selecionaram-se os derivados imobilizados a serem avaliados quanto à estabilidade térmica nas temperaturas de 45°C, 55°C e 65°C. O desempenho obtido pelo derivado em Caulim acidificado e em Diatomita acidificada foram muito semelhantes, apresentando o tempo de meia vida em 45°C que foi de 18,5 horas e 19,5 horas, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (E.C. 3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas solúveis em água muito utilizadas biotecnologicamente visando à obtenção de diversos produtos oriundos de reações com lipídeos (Kappor, 2012). São enzimas que catalisam reações de hidrólise e síntese de triglicerídeos, e a versatilidade de reações catalisadas por essas enzimas são o que as tornaram um grupo tão importante biocatalítico no ramo da biotecnologia, com aplicações biotecnológicas e industriais em diversas áreas, tais como a farmacêutica, de detergentes, alimentícia, têxtil, cosmética e de papel (Karl-Erich *et al*, 2002).

No entanto, para aplicações em larga escala, os biocatalisadores devem ser empregados na forma imobilizada. Isso porque, a imobilização apresenta vantagens como retenção da atividade biológica por mais tempo; facilidade de separação do catalisador e do produto; redução do volume de reação, maior estabilidade ao pH e a temperatura e possibilidade o

reaproveitamento da enzima em processos contínuos. As propriedades dos sistemas imobilizados são influenciadas tanto pelas enzimas quanto pelo material do suporte utilizado, sendo que cabe ao suporte a maior contribuição para o desempenho do sistema. Portanto, a escolha de um suporte deve levar em consideração as suas características morfológicas e químicas, bem como a estabilidade química, física e possibilidade de regeneração (Castro *et al*, 2008).

Neste trabalho, serão avaliados suportes de baixo custo, que apresentam potencial para imobilização de enzimas. O Caulim é uma argila branca, bastante empregada na indústria de papel devido à sua resistência e alvura e que, justamente por ser natural, tem grande potencial como suporte por atender a demandas ecológicas (Rahman, 2005). Já a Diatomita é uma matéria-prima mineral, originada pela fossilização de algas diatomáceas, composta principalmente por sílica amorfa hidratada ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ou opalina e impurezas como quartzo, óxidos de ferro, alumínio, sódio potássio, cálcio, magnésio, titânio, matéria orgânica, entre outros. É um material leve e poroso, o que mostra-se como uma importante vantagem quando se trata de imobilização de enzimas (França *et al*, 2005). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar, dentre diferentes suportes, qual poderia conferir maior estabilidade térmica à lipase de *Rhizopus oryzae*, imobilizada por adsorção física.

2. MATERIAIS

Os experimentos foram efetuados empregando preparação de lipase de *Rhizopus oryzae*, de grau alimentício gentilmente cedida pela Prozyn (São Paulo). Os suportes utilizados foram Caulim e Diatomita, cedidos pelo Laboratório de Peneiras Moleculares (LABPEMOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

3. METODOLOGIAS

3.1. Acidificação

O processo de acidificação do suporte foi realizado utilizando-se uma solução de ácido nítrico 1%, conforme descrito por Miranda (2004).

3.2. Imobilização

O suporte foi imobilizado utilizando meio orgânico (hexano), conforme descrito por Paula (2012).

3.3. Determinação da Atividade Enzimática de Esterificação

A atividade de esterificação da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido oleico (12,6mL) e etanol (2,4mL), de acordo com metodologia descrita por Pinto *et al* (2014).

3.5. Determinação da Atividade Enzimática de Hidrolítica

Foi determinada pelo método de retrotitulação, empregando-se emulsão de azeite de oliva, tal como descrito por Paula (2012).

3.6. Rendimento de Imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado usando a equação 1:

$$r(\%) = \frac{U_0 - U}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

em que, U_0 = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização; U = unidades de atividade hidrolítica total presente no suporte.

3.7. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi determinada pela incubação dos derivados imobilizados em banho termostatzado sem agitação durante 0h, 2h, 4h, 6h e 8h, nas temperaturas de 45°C, 55°C e 65°C. Após a incubação da enzima nos variados tempos foi efetuada a atividade hidrolítica residual que foi quantificada de acordo com o item 3.5. A atividade relativa (%) foi calculada de acordo com a equação 2.

$$AR(\%) = \frac{U_n \times 100}{U_0} \quad (2)$$

em que AR é a atividade relativa no tempo t ; U_n é a atividade obtida no tempo t e U_0 é a atividade obtida no tempo 0 horas.

Foi considerada uma cinética de primeira ordem para desativação, sendo a constantes de desativação (K_d , h^{-1}) calculadas pela equação 3 e o tempo de meia vida (tm), pela equação 4:

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (3)$$

em que: A_0 = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (t).

$$tm = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (4)$$

Em que tm é o tempo de meia vida (h) e K_d é dado em h^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Atividade Hidrolítica e Rendimento de Imobilização

Os dados referentes à atividade hidrolítica e ao rendimento de imobilização estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos diversos derivados imobilizados.

Suporte empregado	Caulim	Caulim Acidificado	Diatomita	Diatomita Acidificada
Atividade Hidrolítica média \pm Desvio padrão (U/g)	1561,51 \pm 26,93	1409,04 \pm 51,07	1368,66 \pm 18,55	1235,67 \pm 9,56
Rendimento de Imobilização (%)	25,68	23,78	21,62	20,21

Com relação aos valores de atividade hidrolítica, a análise dos dados da Tabela 1 revela que o derivado imobilizado em Caulim forneceu o valor mais elevado de atividade hidrolítica (1561,51 \pm 26,93 U/g). Isto representa um aumento de 26% em atividade hidrolítica, se comparado à Diatomita acidificada, com a qual se obteve atividade de 1235,67 \pm 9,56 U/g.

O processo de acidificação do suporte foi realizado visando-se avaliar se um tratamento na superfície do suporte poderia favorecer a imobilização da lipase, fornecendo melhores resultados de rendimento de imobilização. No trabalho de Miranda (2004), realizou-se o tratamento do suporte óxido nióbio para abertura de seus poros, antes de empregá-lo na imobilização da lipase. Entretanto, é possível identificar que essa técnica não alterou significativamente a atividade hidrolítica.

4.2. Atividade de Esterificação

Após a avaliação da atividade hidrolítica, realizou-se a quantificação da atividade de esterificação dos derivados imobilizados, e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade de esterificação dos diversos derivados imobilizados.

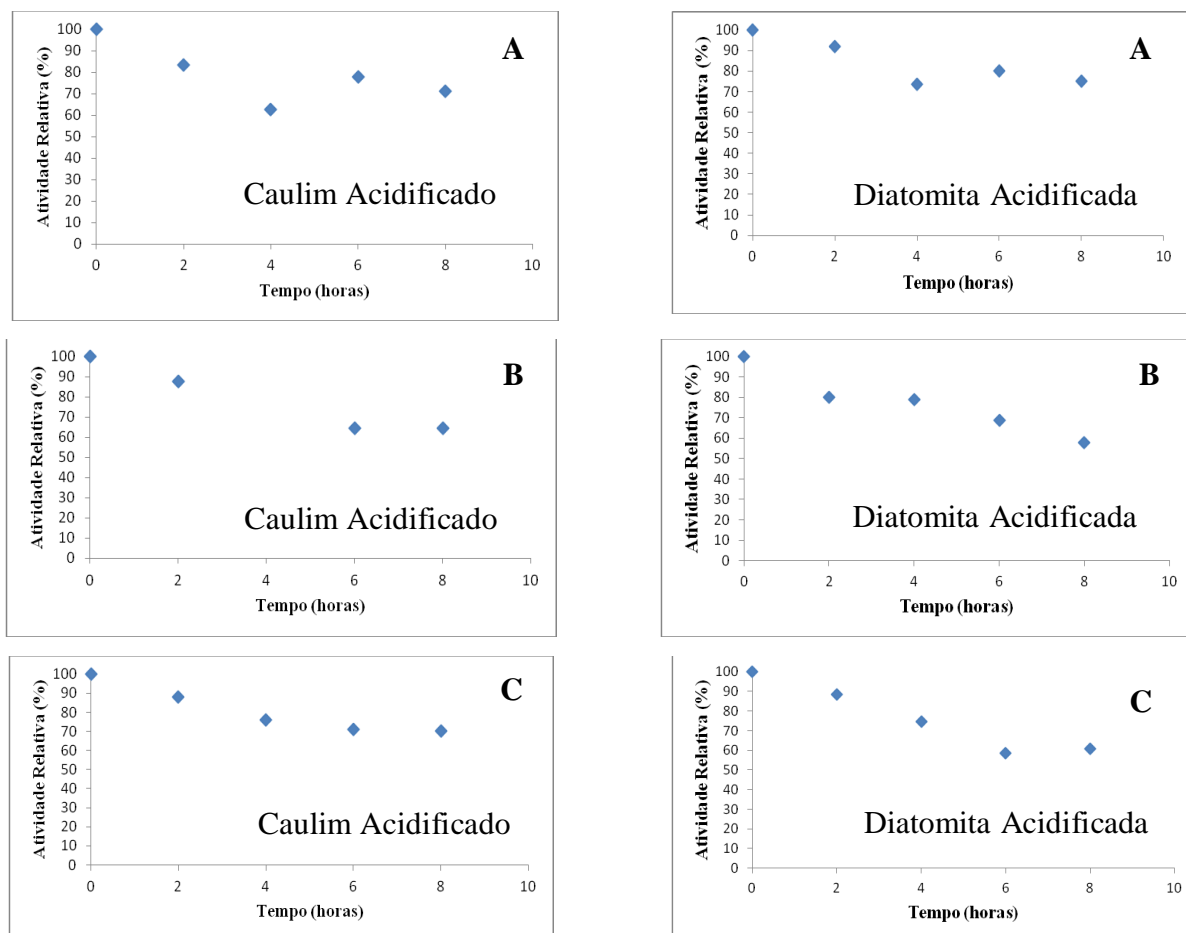
Suporte empregado	Atividade Esterificação (U/g)
Caulim	1109,91
Caulim Acidificado	1827,99
Diatomita	908,30
Diatomita Acidificada	1722,66

É possível notar que, no caso da atividade de esterificação, a acidificação dos suportes favoreceu o aumento na atividade do biocatalisador. Assim, para a etapa de estabilidade térmica foram selecionados Caulim e Diatomita acidificados, uma vez que estes forneceram satisfatórias atividades hidrolítica e de esterificação.

4.2. Estabilidade Térmica

Os valores de atividade relativa do derivado imobilizado em Caulim e Diatomita acidificados, em função do tempo, para cada temperatura avaliada é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Perfil de decaimento da atividade do derivado imobilizado em Caulim e Diatomita acidificados no decorrer do tempo sob diferentes temperaturas, em que A representa o perfil a 45°C, B a 55°C e C a 65°C.



O derivado imobilizado em Caulim apresentou satisfatória estabilidade térmica com valores de atividade hidrolítica que se mantiveram praticamente constantes no decorrer do tempo de incubação. Nas três temperaturas, após as 8 horas ainda havia atividade realtiva de aproximadamente 70%. Quanto à diatomita acidificada, observou-se uma queda na atividade após as 8 horas de incubação e, nesse caso, a temperatura de 45°C apresentou uma atividade relativa de 75%, enquanto nas demais temperaturas observou-se uma atividade relativa de aproximadamente 60%.

A partir dos dados de estabilidade térmica, foram calculados os valores de constante de desativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase de *Rhizopus oryzae* em diferentes temperaturas, quando imobilizada nos suportes. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Pode-se constatar que os resultados obtidos para os derivados imobilizados nos dois materiais não apresentaram grandes diferenças. Na temperatura de 45°C obtiveram-se os melhores resultados para em ambos os derivados imobilizados e, conseqüentemente, a maior estabilidade térmica.

Tabela 3 – K_d e tempo de meia vida da lipase de *Rhizopus oryzae* em diferentes temperaturas, quando imobilizada em diferentes suportes.

Suporte	45°C		55°C		65°C	
	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
Caulim Acidificado	0,037	18,48	0,073	9,39	0,059	11,79
Diatomita Acidificada	0,036	19,47	0,067	10,28	0,089	7,81

6. CONCLUSÃO

A imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* nos suportes apresentados mostrou-se inovadora quando considerado o baixo custo apresentado por esses materiais, permitindo a obtenção de derivados imobilizados com satisfatória estabilidade térmica.

7. REFERÊNCIAS

- CASTRO, H. F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização; In: BON, E.P.S.; FERRAR, M. A.; CORVO, M. L; *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 123-151, 2008.
- FRANÇA, S.C. A., LUZ, A. B., INFORÇATI, P. F.; Diatomita. Rochas e Minerais Industriais. *Cetem*, p. 300-411, 2005.
- KAPOOR, M., GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* v.47, p. 555-569, 2012
- MIRANDA, M. Aprimoramento do processo de imobilização de lipase microbiana em óxido de nióbio para modificação de óleos vegetais. *Dissertação de mestrado em Eng. Quím.*, Universidade de São Paulo, Lorena, 2004.
- PAULA, A. V.; Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. *Tese de doutorado do programa de pós-graduação de Biotec. Industrial na área de Microbiologia Aplicada*, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- PINTO, M. C. C., FREIRE, D.M.G., PINTO, J. C. Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. *Molecules*, v. 19, p. 12509-12530, 2014.
- RAHMAN, M. B. A., TAJUDIN, S. M., HUSSEIN, M. Z., RAHMAN, R. N. Z. A., SALLEH, A. B., BASRI, M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Appl. Clay Sci.*, v. 29, p. 111-116, 2005.

8. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo 2016/15748-9) e à Prozyn (São Paulo) pela doação do biocatalisador.