

ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SUPORTE DE POLIURETANO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E PH

N. L. D. Nyari¹; R. Scherer¹; J. Zeni¹; I. A. Fernandes¹; A. R. Paulazzi¹; A. M. M. Ficanha¹; R. M. Dallago¹;

1-Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada – URI - Erechim, Av. Sete de Setembro 1621, Tel: 0555435209000/Fax: 0555435209090, Erechim - RS, 99700-000, Brasil.

RESUMO: As enzimas em sua maioria são catalisadores de natureza protéica. São versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para vários tipos de reações orgânicas. Técnica de imobilização vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para enzimas em meio orgânico, facilitando sua recuperação. O ponto de partida desse trabalho foi a imobilização das lipases de *Candida antarctica* B (CAL B) (0,16 g) a 10 % por confinamento em suporte de Poliuretano (60/40%) na utilização desses sistemas nas reações síntese. O imobilizado permaneceu estável com 80% de atividade no decorrer de 450 dias em temperatura ambiente (10 a 25 °C) já a temperatura de refrigerador (2 a 8 °C) obteve 52 % em 360 dias de armazenamento. Em contrapartida quando exposto a pH neutro no decorrer de 60 dias apresentou atividade de 63, 59, 55 e 50 % para pHs 5, 6, 7 e 8. Mostrando ser um catalisador eficiente quando aplicado na indústria de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Poliuretano, Lipase, *Candida antarctica* B (CAL B).

1. INTRODUÇÃO.

As enzimas são catalisadores biológicos, em geral, de natureza proteica formada por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. São encontradas na natureza em todos os seres vivos. As enzimas possuem atividade catalítica, diferente de outras proteínas, por possuir conformação e composição química do sítio ativo, isto é, cada enzima poderá hidrolisar ou sintetizar um composto em particular (Hollmann *et al.*, 2009; Shankar *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de pesquisas na área de esterificação enzimática tem sido crescente nas duas últimas décadas. As lipases têm se destacado principalmente em de biotecnologia, na indústria de alimentos como desenvolvimento de aromas e manutenção de queijo, de detergentes, hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biossurfactantes, biodiesel, produção de bebidas alcoólicas destiladas, tratamento de resíduos oleosos oriundos da indústria de couro e de papel (Shankar *et al.*, 2013).

Uma das lípases mais utilizadas comercialmente é a obtida a partir do fungo *Candida antarctica* devido à facilidade industrial de obtenção do meio de cultura e devido a versatilidade da enzima obtida, podendo ser utilizada em diversas reações em sistema de catalíticos convencionais (em fase aquosa) ou não convencionais (em solventes orgânicos). E também conhecida como CAL B é um versátil e bem caracterizado biocatalisador em diversas sínteses orgânicas e biotransformações, apresentando similaridade aos demais α/β -hidrolases (Widmann *et al.*, 2010). Apresenta ainda amplas condições de trabalho, em faixas de pH entre 6,0 a 8,0 e temperaturas que variam de 25 °C a 50 °C (podendo chegar a acima de 70 °C quando na forma imobilizada) (Tamalampudi *et al.*, 2007).

Para aperfeiçoar essas características e necessário que o biocatalisador esteja imobilizado, principalmente no que se refere a manter a atividade e estabilidade, e fazendo com que modificações estruturais bem como de seu sítio ativo não ocorram (Fehér *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009).



Os poliuretanos (PU) têm sido muito utilizados como suportes enzimáticos nas reações em meio orgânico devido à sua resistência aos solventes orgânicos. Na imobilização em espumas de poliuretano a lipase fica retida na estrutura porosa da matriz por meio de ligações covalentes (Correia, *et al.*, 2011). Por possuir certa flexibilidade e uma infinita variedade de compostos diferentes de propriedades físicas, químicas e morfológicas de acordo com necessidades específicas de aplicação fazendo com que os PU ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (Albiquim, 2013; Santos, 2011).

Nesse contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade da lipase imobilizada de *Candida antarctica* tipo B imobilizada por confinamento em poliuretano submetidas a diferentes temperaturas e faixas de pHs.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) de alta qualidade adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda.

Os monômeros comerciais Polioliol e Isocianato utilizados nesse trabalho foi, oferecida pela Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes.

2.2 Métodos

Imobilização:

O procedimento para imobilização da CAL B em PU foi realizada utilizando uma solução enzimática (correspondendo a 10 % do volume total dos monômeros) contendo 0,16 % de enzima adicionada aos monômeros polioliol e isocianato (60/40 %). A reação foi conduzida com auxílio de uma seringa graduada na qual os monômeros foram misturados e homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, durante 30 segundos. Posteriormente, ocorreu o estágio de polimerização (5 min) do poliuretano, conduzido pela expansão da espuma e completa solidificação, possibilitando a visualização da conformação, flexibilidade, maciez, firmeza, porosidade interna e resistência (Santos, 2011).

Estabilidade a diferentes temperaturas:

A estabilidade da CAL B imobilizada em PU foi investigada a temperatura ambiente (10 a 25 °C) e refrigerador (2 a 8 °C), incubou-se a enzima imobilizada em frascos de polipropileno com tampa. A estabilidade foi avaliada no decorrer do período avaliado.

Estabilidade a diferentes pH:

A estabilidade a diferentes pH foi realizada incubando-se a enzima imobilizada com a solução tampão em diferentes pH (3 a 10) em tubos de ensaio com tampa a temperatura ambiente (10 a 25 °C). Onde este após 24 h foi retirado, filtrado em papel filtro e deixado em estufa a 40 °C por 30 min. Após foi pesado e submetido a determinação da atividade pelo método de esterificação.

Determinação da atividade de esterificação:

A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul *et al.*, 2011). Pesou-se 0,1 g do imobilizado, adicionou-se ácido oleico e etanol, levado a agitador orbital a 40 °C, por 40 minutos a 150 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona:etanol (1:1) (v/v). Os brancos reacionais também foram quantificados, retirados no início da reação.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M até pH 11. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 1.

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

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g); V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL); M = molaridade da solução de NaOH; V_f = volume final de meio reacional (mL); t = tempo (min); M_{EL} = peso da enzima livre (solução enzimática)/imobilizada; V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES



Estabilidade a diferentes temperaturas

A estabilidade do imobilizado (PU + Enzima) na forma seca, armazenada a temperatura ambiente (10 a 25 °C) e refrigerador (2 a 8 °C) apresenta-se na Figura 1. O resultado do comportamento da enzima imobilizada em PU no

decorrer de 360 dias de armazenamento a temperatura de refrigerador apresentou atividade residual de 52 %, enquanto a temperatura ambiente se mostrou com comportamento diferente, onde no decorrer de 450 dias apresentou comportamento estável de 80 % da atividade inicial.

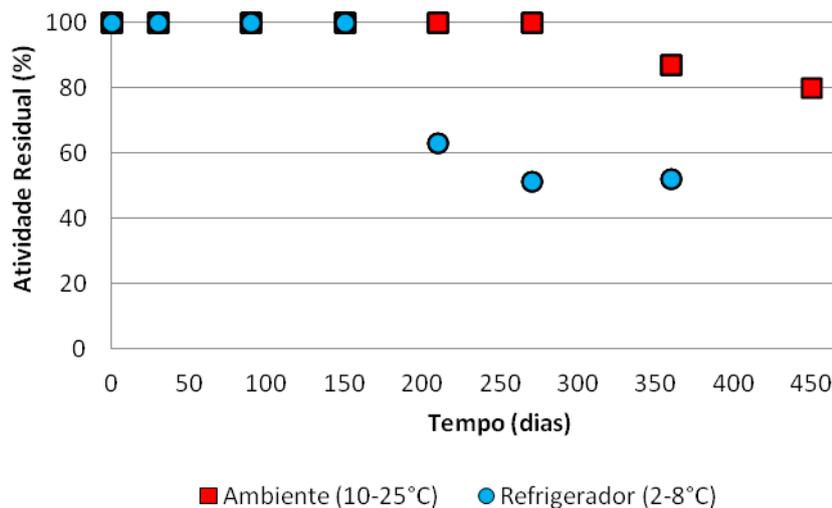


Figura 1. Estabilidade da Lipase *Candida antactica* B imobilizada em suporte de Poliuretano submetida a temperatura ambiente (10 a 25°C) e de refrigerador (2-8°C).

Cadena et al. (2010) realizou um experimento usando a enzima invertase imobilizada em PU e obteve estabilidade por um período de 60 dias, sem perda considerável atividade (68,5% de retenção da atividade). Ondul et al. (2012) em seu estudo usando lipase de *Candida antarctica* A (CAL A) e *Thermomyces lanuginosus* (TL) imobilizada através adsorção em pano de algodão felpudas fibrilas, usando 0,2 % de polietilenoimina (PEI) e 0,2 % de glutaraldeído, obteve resultados satisfatórios no decorrer de 28 dias de armazenamento em um refrigerador e em uma incubadora manteve sua atividade de 80 e 60 % respectivamente.

O experimento usando a enzima CAL B imobilizado em Accurel (polipropileno) e poliestireno aumentou de três vezes no tempo de estabilidade em relação à enzima livre, que apresentou um tempo de meia vida de apenas 5 dias (Branco et al., 2006).

Estabilidade a diferentes pH

O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. As enzimas apresentaram pH ótimo, onde a atividade e a velocidade das reações são máximas. Sendo assim, estudou-se o efeito do pH de 3,0 a 10 sobre a atividade da enzima CAL B imobilizada em poliuretano no decorrer do tempo de exposição.

O efeito da atividade enzimática no decorrer de 60 dias apresentou 50 % submetida a pH 3, 60 % em pH 4, 59 % em pH 9 e 52 % em pH 10. Já quando exposto num tempo de 90 dias as atividade de 63 % em pH 5, 59 % em pH 6, 55 % em pH 7 e 50 % em pH 8 respectivamente mostrado na Figura 2. Este fato pode estar relacionado com sítio ativo conter aminoácidos ionizados que podem provocar modificações conformacionais. Desta forma, o pH do meio pode conter carga elétrica positiva, negativa ou neutra, variando diretamente a atividade catalítica, sendo chamado de pH ótimo, quando ocorre mudanças



bruscas de variação pode provocar desnaturação da proteína imobilizada, estando diretamente ligada

com o tempo de exposição.

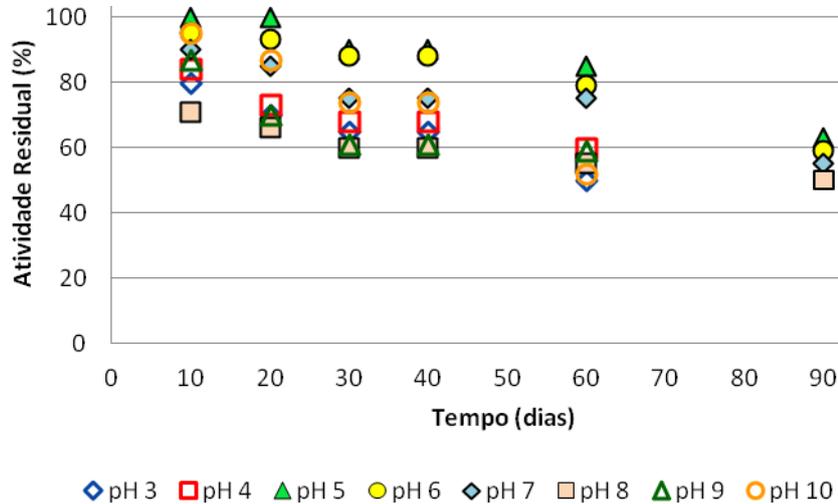


Figura 2. Estabilidade da Lipase *Candida antactica* B imobilizada em suporte de Poliuretano submetida a diferentes pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Os resultados são satisfatórios e demonstra que o imobilizado exposto a soluções alcalinas e ácidas apresenta ótima estabilidade no decorrer do período avaliado. Zhenga *et al.* (2012) em seus estudos com a lipase *Candida rugosa* em poli magnética (glicidilalil éter co etileno glicol dimetacrilato) de microesferas de polímero exibiu atividade máxima a um pH de 7,0 e 8,0 com atividade residual de 13,1 % e 41,2 % respectivamente e para pH 10 de 37,3 %. Pahujani *et al.* (2008) imobilizou *Bacillus coagulans* BTS-3 ativada glutaraldeído em Nylon-6 e obteve atividade estável em pH entre 7,5 e 9,5 com 88 % de sua atividade original por 2 horas.

4. CONCLUSÕES

A imobilização de CALB em poliuretano rendeu um derivado ativo e estável a temperaturas de refrigerador e ambiente, e principalmente, a solventes ácidos e alcalinos. Os resultados indicaram que o biocatalisador é eficiente para a

A lipase imobilizada mostra melhor estabilidade e resistência ao pH 5, 6, 7 e 8, isso se deve principalmente ao o método de imobilização e a interação da enzima e suporte (Yilmaz *et al.* 2011). Já *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada por diferentes protocolos de ativação como glioxil (licidol e epicloridrina) e em quitosana-alginato, foram mais estáveis na região alcalina, revelaram atividades máximas em pH 8. Enquanto imobilizada em hidrogel ativado com glutaraldeído apresentou-se muito mais estável na região ácida (Mendes *et al.*, 2013).

utilização na indústria, podendo ser aplicado na síntese contínua de ésteres e se torna uma alternativa de extrema importância, pois, aumenta a possibilidade de utilização deste biocatalisador em outros estudos.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química, disponível em: <http://ebiquim.org.br/poliuretanos/quimicamente.htm>, acesso em 20 de fevereiro de 2013.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLE, G. **Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts.** *J. Mol. Catal.* v. 30, p. 83-93, 2004.



CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A. S, MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. **Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron.** *Bioresource Technol.* v.101, 2010.

CORREIA, A. C. V. B.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, M. S. L. **Produção de Emulsionantes através da Glicerólise de Óleo de Bagaço de Azeitona Catalisada pela Lipase da *Candida rugosa* Imobilizada em Espumas de Poliuretano,** 2011.

FEHÉR, Y.; ILLEOVÁ, V.; KELEMEM-HORVÁTH, I.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; POLAKOVIC, M.; GUBICZA, L. J. **Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid-alcohol.** *Mol. Catal. B: Enzym.* v. 50, p; 28-32, 2008.

HOLLMANN, F.; GRZEBYK, P.; HEINRICHS, V.; DODERER, K.; THUM, O. **On the inactivity of *Candida antarctica* lipase B towards strong acids.** *J. Mol. Catal.* v. 57, p. 257-261, 2009.

ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. **Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine.** *Colloids Surfaces B,* v. 95, p. 109-114, 2012.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. **Transformações biológicas: contribuições e perspectivas' Biological transformations: contributions and perspectives,** *Quím. Nova,* 3 edição, n 3, v. 32, 2009.

PAHUJANI, S.; KANWAR, S. S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. **Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization:**

Enzyme characteristics and stability. *Bioresource Technol.* 99(7), 2566-2570, 2008.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **Solvent-free geranyloleate production by enzymatic esterification.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* (Print) v. 34, p. 323-329, 2011.

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.

SHANKAR, S.; MADHU, A.; CHAURASIA S. P. **Study of reaction parameters and kinetics of esterification of lauric acid with butanol by immobilized *Candida antarctica* lipase,** *IJBB.* V. 50, p. 570-576. 2013.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. M. R.; HAMA, S.; TANINO, T.; SUZUKI, Y.; KONDO, A.; FUKUDA, H. **Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*.** *Appl. Microbial. Bio.* v. 75, p. 387-395, 2007.

YILMAZ, E.; CAN, K.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester.** *Bioresour. Technol.* v. 102, p. 499-506, 2011.