



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estudo da Otimização da Imobilização e da Estabilidade Operacional (Reciclo) da Lipase CALB Imobilizada em Xerogel Obtidos pela Técnica sol-gel

Aline Matuella M. Ficanha¹, Angela Antunes¹, Mateus Henrique Bospin¹, Jamile Zeni¹, Eloane Malvessi², Rodrigo Souza³, Rogério Marcos Dallago¹, Marcelo Mignoni¹

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI Campus de Erechim- Engenharia de Alimentos- CEP 99700-000 - Erechim - RS

²Universidade de Caxias do Sul - UCS- Caxias do Sul- Engenharia de Alimentos- CEP 95070-560 - Caxias do Sul - RS

³Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ- Faculdade de Farmácia- Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro – RJ

E-mail: alinematuella@gmail.com

RESUMO

A imobilização de enzimas permite obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre, o que possibilita uma operação contínua do processo, e facilita o controle e separação do produto final. Objetivou-se determinar a concentração de enzima e aditivo na imobilização da lipase CALB para a obtenção da máxima atividade de esterificação (AE) na síntese de oleato de etila com o uso da metodologia de superfície de resposta e estudar a estabilidade operacional. A otimização da concentração das variáveis na imobilização foi realizada através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O modelo de regressão apresentou uma correlação de 0,956 com os dados experimentais. O F calculado (21,93) apresentou-se maior que o F tabelado (5,05) o que validou o modelo proposto. O ponto otimizado apresentou melhor estabilidade operacional a 40°C com 10 reusos, considerando uma atividade residual de 50%.

Palavras-chave: Esterificação, atividade residual, *Candida antarctica* B.

INTRODUÇÃO

A enzima lipase 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 a um aumento das propriedades cinéticas, eficiência de reação, reutilização (Ozyilmaz e Gezer, 2010).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido amplamente empregada para proteger e obter estabilidade da amostra enzimática durante o processo catalisado pela mesma. Dentre as técnicas de imobilização de enzimas, o encapsulamento obtido pela técnica sol-gel tem sido explorado e é indiscutivelmente a técnica mais utilizada para preparo de uma matriz híbrida, na qual a enzima fica retida no interior da matriz e forma um reticulado tridimensional (gel) (Jose e Prado, 2005; Soares et al., 2006; Kim et al., 2006).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A técnica sol-gel apresenta algumas desvantagens decorrentes do processo de encapsulamento, uma destas, trata-se do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada, que pode ser atribuído à estrutura porosa, bem como a inativação ou desnaturação da enzima. Uma alternativa para se contornar estas desvantagens durante o processo de imobilização é a utilização de aditivos (Soares et al., 2006).

Os aditivos influenciam no aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas, pois protegem a enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima (Souza, 2012).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi otimizar o processo de imobilização da lipase CALB em xerogel para a obtenção da máxima atividade de esterificação (AE) na síntese de oleato de etila com o uso da metodologia de superfície de resposta e estudar a estabilidade térmica do xerogel otimizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Otimização do processo de imobilização da lipase CALB pela técnica de sol-gel

A lipase CALB foi imobilizada de acordo com Ficanha et al., (2015). O precursor da sílica tetraetilortosilicato foi dissolvido em álcool etílico absoluto, após, foram adicionados o catalisador e a água destilada. A mistura ficou sob agitação por 90 minutos, 40 °C, 180 rpm. Após, adicionou-se a solução enzimática e o aditivo polietilenoglicol (conforme o planejamento), e a solução hidrolisante. A mistura foi mantida em condições estáticas por 24 horas para completar a condensação química. Após, foi condicionada em dessecador sob vácuo por mais 24 horas para a completa secagem. Após a secagem, o suporte foi armazenado para os posteriores testes.

Tabela 1. Planejamento experimental para otimização do processo de imobilização

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Enzima (g)	0,03	0,05	0,10	0,15	0,17
Aditivo (g)	0,06	0,10	0,20	0,30	0,34

Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela capacidade de síntese do oleato de etila realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Esta reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada (0,1 g de suporte) ao meio reacional e a reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm, 40 min. A quantidade de ácido consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M (Ferraz et al., 2012).

Análise estatística

Os resultados da atividade de esterificação obtidos nos planejamentos foram analisados através de Análise de Variância e Metodologia de Superfície de Resposta com o uso do módulo Experimental Design do Software Statistica 8.0.

2.6. Efeito da temperatura na estabilidade operacional (reuso) na reação de esterificação

A estabilidade operacional foi determinada em reações de esterificação, em regime de bateladas consecutivas com a reutilização dos xerogéis otimizados. Neste estudo, empregou-



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

se em todas as bateladas a mesma massa de xerogel imobilizado (0,1 g). Foram realizadas bateladas de 40 min, em diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C) e agitação de 160 rpm. Após cada batelada, o meio reacional (fase líquida) foi removido, mantendo a fase sólida (xerogel imobilizado).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Otimização do processo de imobilização da lipase CALB pela técnica de sol-gel

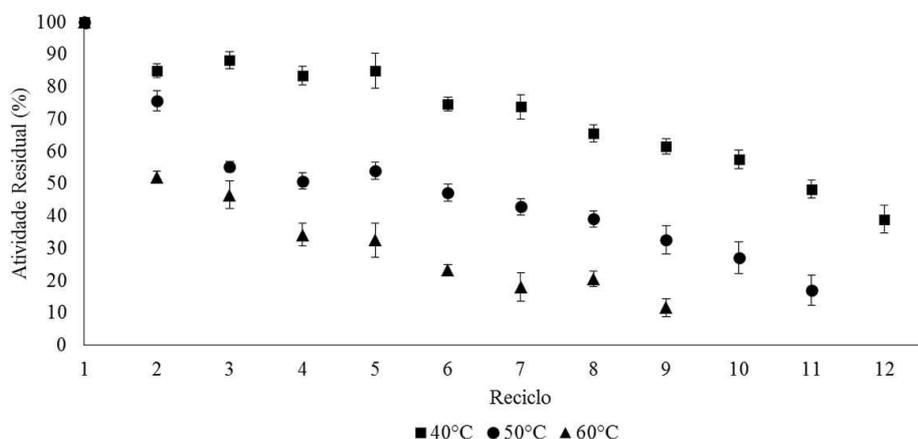
Para a análise de variância dos resultados de atividade de esterificação da lipase imobilizada obtidos no DCCR, verifica-se que a enzima e aditivo apresentaram efeitos lineares e quadráticos significativos negativos ($p < 0,05$). Este efeito comprova os resultados da Tabela 1, que indica que o aumento destas variáveis corresponde a redução da atividade de esterificação. Este comportamento foi similar aos relatados por Soares et al. (2003) onde a variação da massa de enzima apresentou uma redução do rendimento de imobilização quando a concentração da lipase foi aumentada do nível mínimo (0,1 g) para o nível máximo (0,3 g) confirmando o efeito negativo da massa de enzima. O modelo (Equação 1) foi validado pela análise de variância na qual se obteve um coeficiente de correlação de 0,956 e o F calculado (21,93) foi maior do que o F tabelado (5,05)

$$AE = 1077,97 - 162,67 X_1 - 312,81 X_1^2 - 184,66 X_2 - 175,85 X_2^2 - 111,69 X_1 \cdot X_2 \quad \text{Equação 1}$$

Os cálculos da otimização da imobilização pela concentração de enzima e aditivo ótimos para obtenção da máxima atividade de esterificação foram realizados igualando-se a primeira derivada da atividade em função da concentração de enzima e aditivo à zero. As máximas atividades de esterificação na imobilização foram obtidas no nível -0,176 para a concentração de enzima e -0,469 para a concentração de aditivo, correspondendo a valores de 0,09 e 0,15 g de enzima e aditivo, respectivamente.

Efeito da temperatura na estabilidade operacional (reuso) na reação de esterificação

A Figura 1 apresenta a estabilidade operacional do xerogel imobilizado em diferentes temperaturas reacionais para a síntese de oleato de etila.



Observa-se na Figura 1 que os ciclos foram reduzidos conforme o aumento da temperatura, o que indica que a temperatura reacional interfere na estabilidade da enzima



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

imobilizada, favorecendo a perda de atividade. Foi possível reutilizar o xerogel nucleofílico por 10 vezes na temperatura de 40°C, 5 vezes a 50°C e 2 vezes a 60°C. Estes resultados confirmam os já estudados pelo grupo para a estabilidade térmica desses xerogéis já descrito na literatura (Ficanha et al., 2015). Resultados similares para a estabilidade operacional aos obtidos nesse trabalho são observados na literatura para imobilizado em suportes obtidos via sol-gel.

CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta permitiu a otimização das condições de imobilização da lipase com as variáveis concentração de enzima e aditivo para a obtenção das máximas atividades de esterificação. Segundo o DCCR, as máximas atividades de esterificação foram obtidas no ponto central, em concentrações de enzima e aditivo de 0,1 e 0,2 g respectivamente. As concentrações de enzima e aditivo otimizadas preditas pelo modelo estatístico foram de 0,09 e 0,15 g. A metodologia fez com que fosse possível localizar uma região de trabalho desejável, na qual, ocorreu um melhor desempenho na atividade de esterificação após a imobilização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a URI Erechim, CAPES, CNPq e FAPERGS pela infraestrutura e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferraz LR, Oliveira DS, Silva MF, Rigo E, Di Luccio M, Oliveira JV, Oliveira D, Treichel H. 2012. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatal Agric Biotechnol* 1:243-252.
- Ficanha AMM, Nyari NLD, Levandoski K, Mignoni ML, Dallago RM. 2015. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. *Quim. Nova* 38:364-369.
- Jose NM, Prado LAS. 2005. Materiais híbridos orgânicos inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. *Quim. Nova* 28:281-288.
- Kim J, Grate JW, Wang P. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci* 61:1017-1026.
- Ozyilmaz G, Gezer E. 2010. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 64:140-145.
- Soares CMF, Santana MHA, Zanin GM, Castro HF. 2003. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. *Quim Nova* 26:832-838.
- Soares CMF, Santos OA, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. 2006. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 39:69-76, 2006.
- Souza, RL. 2012. Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes. Aracajú-SE.