



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Imobilização da Lipase CALB em Xerogel Obtido pela Técnica Sol-gel Utilizando TMOS como Precursor da Sílica

Angela Antunes<sup>1</sup>, Aline Matuela Moreira Ficanha<sup>1</sup>, Katarine Lia Dorigon Levandoski<sup>1</sup>,  
Mateus Henrique Bospin<sup>1</sup>, Eloane Malvessi<sup>2</sup>, Rodrigo Souza<sup>3</sup>, Jamile Zeni<sup>1</sup> e Rogério  
Marcos Dallago<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- Campus de Erechim- CEP 99700-000 -  
Erechim – RS -

<sup>2</sup>Universidade de Caxias do Sul - UCS- Caxias do Sul- Engenharia de Alimentos- CEP 95070-560 - Caxias do  
Sul- RS

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

E-mail: jamilezeni@hotmail.com

#### RESUMO

*Os processos que utilizam lipase são atraentes em função das suas diferentes aplicações. Porém, suas aplicações são limitadas pela baixa estabilidade em longo prazo e a dificuldade em recuperá-las após seu uso. A técnica para imobilizar enzima é conhecida como eficiente maneira de resolver estes problemas. A imobilização de enzimas em matrizes obtidas pelo processo sol-gel é vantajosa, pois, preserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi determinar a concentração das variáveis enzima, aditivo e água na imobilização da lipase comercial CALB. A enzima foi imobilizada em xerogel obtido pela técnica sol-gel, com o uso de TMOS como precursor da sílica. A otimização do processo de imobilização foi realizada por um DCCR 2<sup>3</sup> completo. O  $F_{calculado}$  (22,67) apresentou-se maior do que o  $F_{tabelado}$  (3,68), o que validou o modelo proposto. Após o estudo estatístico, fez-se a avaliação da atividade operacional da enzima onde obteve-se 21 ciclos com aproximadamente 50% de atividade residual da enzima imobilizada.*

Palavras-chave: Atividade de esterificação, planejamento de experimentos, ciclos.

#### INTRODUÇÃO

As aplicações industriais de lipases são frequentemente limitadas pela falta de estabilidade operacional, de armazenamento em longo prazo e a dificuldade existente em recuperá-las após seu uso. A técnica de imobilização é conhecida como uma eficiente maneira de resolver estes problemas e pode fornecer à enzima muitas vantagens como o aumento da atividade enzimática, maior estabilidade e possibilidade de reutilização (Garcia-Galan et al., 2011).

Dentre as técnicas de imobilização utilizadas, destaca-se a imobilização de enzimas em matrizes sol-gel, que consiste em reter a molécula alvo no interior da matriz ou em sua superfície, o que confere estabilidade mecânica e bioquímica superior as técnicas convencionais (Souza, 2013). O tetraetilortosilicato (TEOS) e o tetrametilortosilicato (TMOS) são os precursores mais utilizados para sintetizar silicatos. O uso de polietilenoglicol (PEG) como aditivo na imobilização enzimática concede melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato entre a interface água/óleo, e favorece uma condição necessária para a expressão da atividade hidrolítica da lipase imobilizada (Soares et al., 2001).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Vale salientar que os aditivos não ativam a enzima, em vez disto, apresentam um efeito estabilizante que previne a desnaturação devido sua interação com o suporte (Villeneuve et al., 2000). Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) em xerogel, utilizando TMOS como precursor e otimizar o processo de imobilização utilizando três variáveis: massa total de água, concentração de enzima e aditivo, além do estudo de eficiência da atividade operacional (reciclos) da enzima imobilizada visando posterior aplicação.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Processo de imobilização

A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario et al. (2009). Os suportes foram preparados solubilizando CTMABr em água (diferentes concentrações), solução enzimática e solução do aditivo. Essa solução foi submetida por 1 h sob agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado TMOS e etanolamina. Posteriormente, a solução foi novamente submetida a agitação, em agitador orbital (shaker), por um período de 24 h para completar a secagem do biocatalisador imobilizado.

#### Delineamento experimental

Para a otimização do processo de imobilização, a fim de se obter a máxima atividade de esterificação, um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^3$  completo foi realizado, com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e três pontos centrais. Os níveis das variáveis foram de 0,05 a 0,66 g/mL para a concentração da enzima, de 0,06 a 0,23 g/mL, para a concentração de aditivo e 9,96 a 20 mL para o volume de água (o volume total de água foi formado pela água adicionada, solução enzimática e a solução do aditivo PEG 1500).

#### Eficiência da atividade operacional (reciclos)

A eficiência da estabilidade operacional (reutilização) de lipase imobilizada *in situ* em xerogel foi determinada por emprego de uma quantidade definida de xerogel imobilizada em sucessivos ciclos de síntese de oleato de etilo (Ferraz et al., 2012) (descrito acima). Depois de cada batelada, as amostras foram removidas do meio de reação, lavou-se com água destilada e adicionou-se uma nova solução de ácido oleico e etanol. A atividade residual (AR) de cada ciclo foi calculada tal como apresentado na Equação 1.

$$AR(\%) = \frac{\text{Atividade de esterificação reuso } n}{\text{Atividade de esterificação reuso } 1} \times 100 \quad (1)$$

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### Delineamento experimental

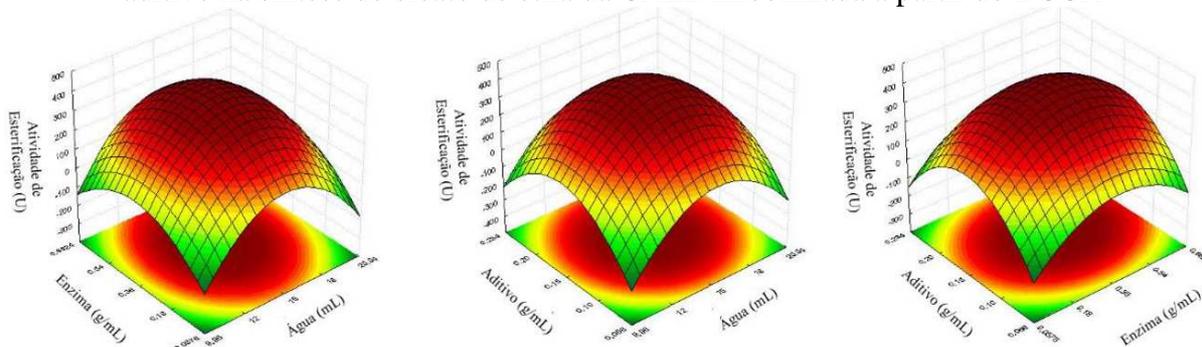
O estudo estatístico mostrou que a maior atividade de esterificação foi observada no ponto central, no qual as concentrações das variáveis água, enzima e aditivo na imobilização da lipase foram 15 mL, 0,36 g/mL e 0,15 g/mL, respectivamente. Os resultados obtidos nos experimentos foram tratados estatisticamente, e o modelo foi validado pela análise de variância, na qual se obteve um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9668 e o  $F_{\text{calculado}}$  (22,67) maior do que



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

o  $F_{\text{tabelado}}$  (3,68). O que permitiu, desta forma, a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 1.

Figura 1. Superfície de resposta da influência da concentração de água, enzima e aditivo na síntese de oleato de etila da CALB imobilizada a partir do DCCR



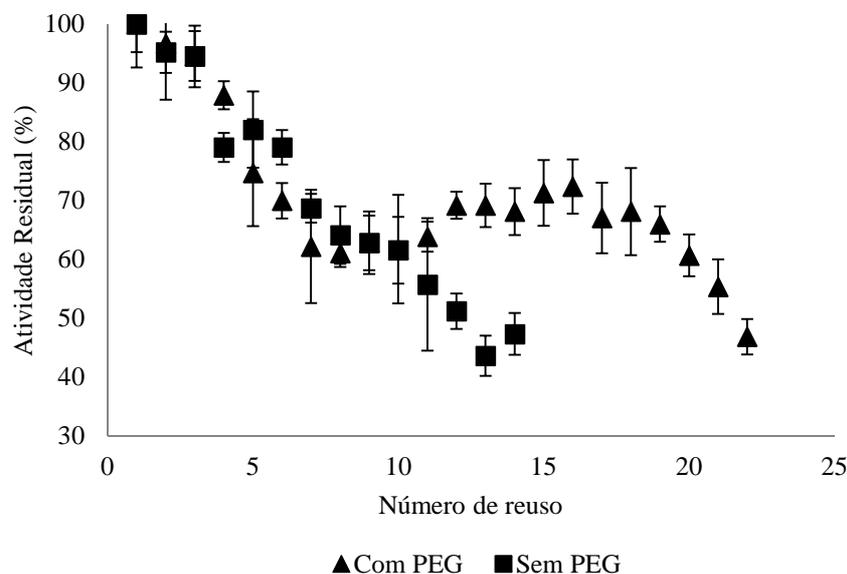
A partir dos resultados do coeficiente de regressão, obteve-se o modelo matemático (Equação 2), na qual todas variáveis lineares e quadráticas bem como a interação entre elas foram significativas e apresentaram  $p < 0,05$ .

$$Y = 12.667X_1 - 81.207X_1^2 + 23.204X_2 - 52.460X_2^2 + 11.253X_3 - 76.273X_3^2 + 5.716X_1X_2 - 3.576X_1X_3 + 1.551X_2X_3 + 392.126 \quad (2)$$

### Eficiência da atividade operacional (reuso)

A capacidade de reutilização (reuso) constitui em um dos parâmetros mais importantes para avaliar a viabilidade econômica e aplicação industrial de biocatalisadores imobilizados; melhoria na estabilidade operacional podem tornar a utilização de enzimas imobilizadas mais vantajosas que a sua respectiva forma solúvel. Os resultados para os reusos são apresentados na Figura 2.

Figura 2. Atividade de esterificação residual do estudo da estabilidade operacional





## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Observa-se que a amostra com aditivo de PEG, depois de 21 ciclos de reutilização, aproximadamente 50% da sua atividade inicial permaneceu, e, 12 ciclos superiores a 50% foram obtidas para imobilizado na ausência de PEG. Este resultado mostrou que a estrutura de poros de superfície e propriedades do transportador foi alterado devido à adição de PEG, o que resulta num ambiente enriquecido catálise de lipase. Na literatura, também foi relatado que a utilização de PEG pode reduzir a lixiviação da enzima quando utilizados em diferentes reatores.

### CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho de imobilização da lipase CALB em sol-gel formado com o precursor silano tetrametilortosilicato, demonstraram que este, em conjunto com o aditivo PEG, são eficientes na imobilização quanto a preservação da atividade catalítica da enzima. Foi possível, pelo DCCR obter valores de massa de água e concentração de enzima e PEG ótimos para a obtenção da máxima atividade de esterificação da enzima imobilizada. A imobilização posterior comprovou a eficiência do método DCCR utilizado para determinar os valores das variáveis estudadas. Além disso, com os parâmetros definidos, tornou possível a realização do estudo para avaliação da eficiência deste suporte, sendo este a estabilidade operacional, onde se teve um resultado promissor para uma futura aplicação do referido suporte.

### AGRADECIMENTOS

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

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferraz, L.R.; Oliveira, D.S.; Silva, M.F.; Rigo, E.; Di Luccio, M.; Oliveira, J.V.; Oliveira, D.; Treichel, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v.1, p. 243-252, 2012.
- Macario, A.; Moliner, M.; Corma, A.; Giordano, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous and mesoporous materials*, v. 118, p. 334-340, 2009.
- Villeneuve, P. Muderhwa, J. M. Graille, J. Haas. M. J. customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- Souza, M. C. M. Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo b em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. Tese de doutorado em engenharia química, universidade federal do ceará, fortaleza, ceará, brasil, 2013.
- Garcia-Galan, C.; Berenguer-murcia, A.; Fernández-lafuente, R.; Rodrigues, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced synthesis & catalysis*, v. 353, 2885-2904, 2011.