



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE CANDIDA ANTARCTICA DO TIPO B EM QUITOSANA ATIVADA COM DIVINILSULFONA: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES ESTÁVEIS E DE BAIXO CUSTO.

B. B. PINHEIRO¹, A. M. M. BESSA¹, J. C. S. SANTOS² e L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável
E-mail para contato: lrgufc@gmail.com

RESUMO – A quitosana é um polímero biodegradável, renovável, de baixo custo e de boa resistência química e mecânica, características que a torna ideal como suporte de imobilização de enzimas. A lipase de *Candida Antarctica* do tipo B (CALB) possui elevada estabilidade e enantioselectividade sendo capaz de atuar em diversas reações de interesse industrial. Nesse contexto, o estudo do preparo do suporte quitosana ativada com divinilsulfona (DVS) foi realizado. A quitosana ativada foi utilizada como suporte para a imobilização de CALB Tipo B. A atividade catalítica do biocatalisador produzido foi verificada pela hidrólise do butirato de paranitrofenila (p-NPB). Os resultados encontrados apresentaram as melhores condições de ativação da quitosana com DVS em pH 12,5, 25 °C de temperatura e 35 minutos de tempo de contato. Nessas condições o biocatalisador obtido apresentou atividade de 1,67 U_{p-NPB}/g de suporte com um rendimento de imobilização de 64,94%, utilizando uma carga enzimática de 0,2 mg de proteína/ g de suporte.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são os biocatalisadores de grande representatividade comercial devido sua ampla disponibilidade, condições suaves de reação e elevada especificidade (BRIGIDA, 2010). A aplicação destas enzimas estende-se a vários setores devido sua versatilidade frente às reações por elas catalisadas (POPPE, 2012) como reações de síntese de produtos químicos finos, formação de biodiesel, síntese de polímeros, entre outras (JAEGER *et al.*, 2002).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



As lipases conseguem agir em interfaces de substratos insolúveis devido seu mecanismo de catálise ser diferente das esterases padrão (SANTOS, 2015; VERGER, 1997). A lipase tipo B de *Candida antarctica* (CAL-B) possui uso bastante diversificado devido sua elevada enantioselectividade (SANTOS, 2011), alta estabilidade, capacidade de atuação sobre vários substratos, além de ser estável em pHs ácidos (NICOLETTI, 2014).

A imobilização tem a finalidade de otimizar as características enzimáticas e permitir o reuso do biocatalisador tornando-o economicamente viável, possibilitando assim sua aplicação industrial (IYER, 2016). A possibilidade de reuso do biocatalisador apresenta, desta forma, vantagens em relação a enzima solúvel ou livre (MATEO *et al.*, 2007).

Tendo em vista que na imobilização a presença de um suporte adequado é de fundamental importância a quitosana foi escolhida, pois é um polímero natural de baixo custo, renovável, biodegradável e insolúvel em água que possui diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, entre outros. A quitosana é definida como quitina desacetilada que por sua vez é o segundo polímero mais abundante na natureza (BEZERRA, 2010).

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos como a divinilsulfona que é capaz de estabilizar a enzima via ligações multicovalentes, em que o grupo vinil-sulfona é muito estável em uma ampla faixa de pH (4-10) e é capaz de reagir com diferentes grupos em condições de pH diferentes (SANTOS, 2015).

Neste trabalho, o objetivo foi determinar o melhor pH de solução para ativação do suporte quitosana com divinilsulfona (DVS), analisados a partir dos resultados experimentais de imobilização obtidos. Os pH's utilizados foram 10, 12,5 e 14 uma vez que o pH alcalino favorece um maior grau de ativação do suporte.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Lipase solúvel de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (6,5 mg de proteína/mL) foi adquirida junto à Novozymes (Espanha). A quitosana utilizada neste trabalho como suporte e o butirato de paranitrofenila (pNPB) utilizado como substrato para determinação da atividade hidrolítica foram comercializados pela Sigma-Aldrich.

2.2. Procedimentos Experimentais

2.2.1. Ativação do suporte quitosana

A ativação do suporte quitosana foi realizado segundo o método utilizado por (SANTOS, 2015). Foram adicionados 10 gramas de quitosana à 7,5 mL de divinilsulfona (DVS) e 200 mL de solução de carbonato de sódio 333 mM a 25°C variando-se o pH da solução entre 10, 12.5 e 14, sob agitação constante por 35 minutos.

2.2.2. Imobilização

A imobilização da lipase solúvel de *Candida antarctica* (CALB) tipo B em quitosana ativada com divinilsulfona ocorreu na presença de Triton-X 0,01% e solução tampão bicarbonato 50 mM pH 10 à 25 °C por 24 horas sob agitação constante. Para a análise do tempo de imobilização a imobilização da CALB ocorreu na presença de Triton-X 0,01% e solução tampão bicarbonato 5 mM pH 10 à 25 °C por diferentes horas sob agitação constante. As imobilizações foram realizadas com uma carga enzimática de 0,2 mg de proteína/ g de quitosana ativada com DVS (suporte).

2.2.3. Determinação da atividade hidrolítica

Determinou-se a atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada pelo método descrito na literatura por (Bhatnagar *et al.*, 2005), com modificações. A hidrólise do butirato de paranitrofenila (substrato) forma o p-nitrofenol sendo a concentração deste quantificada espectrofotometricamente a 400 nm com fator da curva de calibração do pnpb de 0,1027 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{abs})$. Para a determinação da atividade hidrolítica da enzima livre e do substrato adicionou-se 50 μL de solução de enzima à 50 μL de 50 mM de pNPB, em acetonitrila, e 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM à pH 7 e 25 °C. A enzima imobilizada foi mensurada utilizando-se 0,5 mL de pNPB e 25,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM à pH 7 e 25 °C em contato com a enzima imobilizada sob agitação constante de 15 minutos. Definiu-se 1 unidade de atividade catalítica da enzima como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de p-NPB por minuto.

2.3. Parâmetros de Imobilização

Os valores de rendimento de imobilização, atividade do derivado e atividade recuperada foram determinados a partir dos resultados obtidos no processo de imobilização, como mostrado nas equações 1, 2 e 3.

Determinou-se o rendimento de imobilização (%) pela diferença entre a atividade inicial da solução enzimática (At_i) e a atividade do remanescente ou sobrenadante (At_f), de acordo com a Equação 1:

$$R(\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100 \quad (1)$$

A atividade do derivado (U/g) foi determinada pelo slope da curva (α) em abs/minu, fator da curva de calibração do pnp em $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{abs}$, volume de reação (V_R) em mL e a massa do suporte (M_S) em g, de acordo com a Equação 2:

$$At_d = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r}{M_S} \quad (2)$$

Atividade recuperada (%) foi determinada de acordo com a Equação 3:

$$At_r = \frac{At_d}{At_t} * 100 \quad (3)$$

Onde a atividade teórica (At_R) em %, foi calculada utilizando a carga de enzima (quantidade de enzima oferecida por grama de suporte) e o rendimento de imobilização, como mostra a Equação 4:

$$At_t = R * At_{oferecida} \quad (4)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do pH no processo de ativação do suporte quitosana com divinilsulfona foi verificado avaliando os parâmetros de imobilização para cada ativação, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de rendimento de imobilização (%), atividade do derivado (U/g) e atividade recuperada (%) para diferentes pH's de ativação do suporte de imobilização.

| pH | 10 | 12,5 | 14 |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Rendimento (%) | 78,59 ± 2,05 | 64,94 ± 6,18 | 98,32 ± 2,37 |
| Atividade do Derivado (U/g) | 0,20 ± 0,04 | 1,67 ± 0,43 | 0,13 ± 0,04 |
| Atividade Recuperada (%) | 3,60 ± 0,65 | 35,84 ± 5,96 | 1,88 ± 0,61 |

A partir dos resultados da tabela 1 observa-se que, como esperado, a reatividade da enzima com o grupo divinilsulfona difere em valores diferentes de pH's. Desta forma o melhor rendimento (%) de imobilização foi para o suporte preparado à pH 14 obtendo-se 98,32 ± 2,37. No entanto observa-se uma atividade do derivado (U/g) muito baixa de 0,13 ± 0,04 para a imobilização da enzima CALB em suporte ativado neste pH. Isso pode ter ocorrido devido a ativação dos grupos está sendo muito eficiente de forma que a enzima ao ser imobilizada no suporte sofre mudança conformacional perdendo assim a capacidade de catalisar aquele substrato específico (SANTOS *et al.*, 2015 a,b) . Esse resultado também pode ter sido obtido devido o suporte não estar totalmente neutro de forma que o pH elevado do suporte esteja afetando a enzima na solução enzimática que se encontra a pH 10.

Os pH's alcalinos favorecem a ionização dos grupos OH e NH₂ aumentando, desta forma, o grau de ativação do suporte quitosana e favorecendo a imobilização. No entanto observa-se que para o pH de ativação de 12,5 obteve-se a melhor atividade do derivado (U/g) de 1,67 ± 0,43 enquanto as atividades nos pH's 10 e 14 foram muito baixas obtendo-se 0,20 ± 0,04 e 0,13 ± 0,04, respectivamente. Isso pode ter ocorrido devido o pH de ativação de 12,5 manter os grupos reativos estáveis enquanto nos outros dois pH's os grupos são instáveis tornando-se inativos antes do contato do suporte com a enzima (SANTOS, 2015).

Exceto no pH 12,5 os demais pH's obtiveram atividade recuperada (%) muito baixa, em torno de 3,60 e 1,88 para os pH's 10 e 14, respectivamente, enquanto em pH 12,5 a atividade recuperada foi de 36,75 (%) isto deve-se a maior eficiência da imobilização no suporte ativado neste pH.

Analisou-se a influência do tempo na imobilização da CALB em quitosana ativada com divinilsulfona em solução de pH 12,5, uma vez que obteve-se melhores resultados de imobilização neste pH de ativação do suporte. A análise do tempo de imobilização encontra-se na Figura 1.

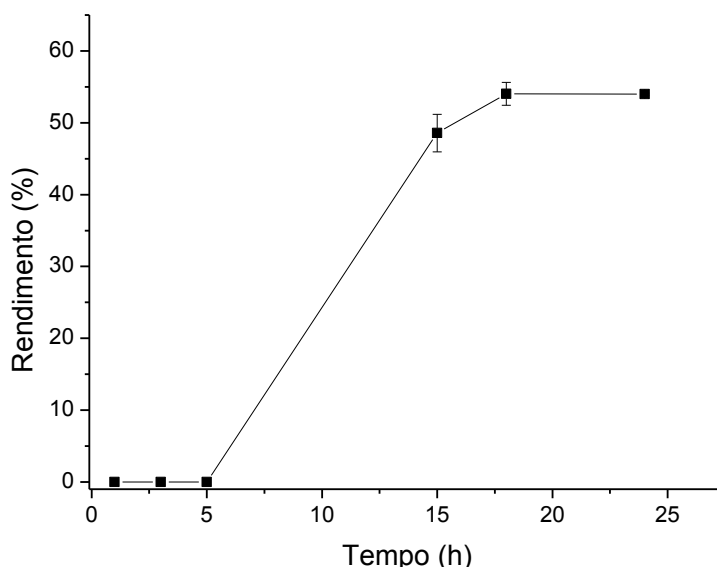


Figura 1– Influência do tempo na imobilização da enzima CALB em quitosana ativada com divinilsulfona em solução de carbonato de sódio a pH 12,5.

Observa-se a partir da figura 1 que até 5 horas de contato entre a enzima e o suporte ativado não houve imobilização. Isso pode ter ocorrido, pois a ligação multipontual covalente requer um tempo bastante longo para que o suporte e a enzima consigam obter o alinhamento correto para conseguir uma ligação covalente multipontual intensa, uma vez que ambos são estruturas rígidas. Os melhores rendimentos foram de 54% obtidos nos tempos de 18 horas e 24 horas, pois para que a imobilização covalente multipontual ocorra se faz necessária a interação de vários resíduos da mesma molécula de enzima com grupos ativos do suporte (SANTOS *et al.*, 2015b). A atividade do derivado (U/g) ao final de 24 horas de imobilização foi de $1,67 \pm 0,43$.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

4. CONCLUSÃO

A imobilização da lipase de *Candida Antarctica* (CALB) tipo B em quitosana ativada com divinilsulfona em pH 12,5 mostrou resultados mais relevantes do que as imobilizações realizadas em suporte ativado a pH 10 e 14, obtendo valores de atividade do derivado (U/g) de $1,67 \pm 0,43$ e de atividade recuperada (%) de $35,84 \pm 5,96$. O melhor rendimento de imobilização foi de 54% para os tempos de 18 e 24 horas. Os resultados mostram que a imobilização de CALB em quitosana ativada com divinilsulfona é promissora e possibilita a futura aplicação desta na resolução cinética do indanol, sendo este o precursor do fármaco Mesilato de Rasagilina utilizado na doença de Parkinson.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento a pesquisa FUNCAP, CNPq e CAPES.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BEZERRA, C.S. Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação. Departamento de engenharia química. Universidade Federal do Ceará. 2010.

BRÍGIDA, A.I.S. Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

K.E. JAEGER, T. EGGERT. Lipases for biotechnology Curr. Opin. Biotechnol, v.13, p. 390–397, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology, v.40, p. 1451-1463, 2007.

NICOLETTI, G. Imobilização de lipase B de *Candida Antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato. Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.

POPPE, J. K. Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de *Candida Antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

IYER, P.V, L. Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment. Ananthanarayan. Process Biochemistry, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

SANTOS, J. C. S. Otimização de biocatalisadores: Desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas. Departamento de engenharia química. Universidade Federal do Ceará, 2015.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

SANTOS, J. C. S; RUEDA, N; BARBOSA, O; FÉRNANDEZ-SÁNCHEZ, J. F; MEDINA-CASTILLO, A . L; RAMÓN-MÁRQUEZ, T; MARTOS, M. C. A; MILLÁN-LINARES, M; PEDROCHE, J; YUST, M. M; GONÇALVES, L. R. B; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilization and stabilize enzymes via multicovalent attachment. Application to chymotrypsin, RSC, p. 20639-20649, 2015a.

SANTOS, J. C. S; RUEDA, N; GONÇALVES, L. R. B; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment, EMT, v.77, p. 1-7, 2015b.

SANTOS, J. C. S. Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, 2011.

SANTOS, J. C. S. Otimização de biocatalisadores: Desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas. Departamento de Engenharia Química. Universidade federal do Ceará, 2015.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. Trends in Biotechnology, v.15, n. 1, p. 32–38, 1997.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

