



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

PERFORMANCE DA IMOBILIZAÇÃO DE CALB EM QUITOSANA-VINILSULFONA E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE (R,S) MANDELATO DE METILA

PINHEIRO BB¹, RIOS NS¹, DOS SANTOS JCS² e GONÇALVES LRB¹

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

² Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Departamento Química

E-mail para contato: lrg@ufc.br

RESUMO – *O suporte quitosana ativado com divinilsulfona foi utilizado para imobilizar a lipase de Candida antarctica do tipo B (CALB). A quitosana também foi ativada com glutaraldeído e utilizada como controle. Rendimentos de imobilização, 70 e 91 % foram obtidos quando a CALB foi imobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona e glutaraldeído, com atividade do derivado de 1.86 e 3.16 U/g, respectivamente. Os biocatalisadores produzidos foram aplicados na hidrólise do R/S metil mandelato a pH 5, 7 e 10. Os resultados mostram que a ativação da quitosana com divinilsulfona é uma boa alternativa para a imobilização de lipases por ligação multipontual.*

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas bastante utilizadas nos processos biocatalíticos, devido à sua ampla especificidade, alta estabilidade e reações que são capazes de catalisar (esterificação, hidrólise, transesterificações, entre outras) (Rueda *et al.*, 2016). A imobilização de enzimas em suportes sólidos oferece grandes vantagens, como: facilidade de manuseamento e recuperação de reação sem considerável perda de atividade catalítica.

A quitosana é um suporte derivado da quitina, obtido pela sua desacetilação. É biocompatível, não tóxico e vem sendo utilizado como suporte para a preparação de diferentes biocatalisadores enzimáticos com lipases (Mendes *et al.*, 2013). No caso da quitosana, a modificação de sua estrutura química é necessária para obter um material quimicamente mais resistente e reduzir sua capacidade de retenção de água (Berger *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a quitosana ativada com divinilsulfona foi utilizada para imobilizar a lipase B de *Candida antarctica* (CALB). As propriedades deste novo biocatalisador serão comparadas àquelas obtidas por imobilização usando glutaraldeído (uma preparação muito estável) e que tem sido utilizado em diferentes processos biotecnológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Lipase B de *C. antarctica* (CALB) foi obtida na Novozymes (Espanha). Quitosana, Divinilsulfona (DVS), etilenodiamina (EDA) e butirato de paranitrofenila foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

2.2. Procedimentos Experimentais

2.2.1. Ativação da quitosana

A ativação da quitosana com divinilsulfona (DVS) foi realizada conforme descrito na literatura por Santos et al., (2015a), com modificações. A ativação da quitosana com glutaraldeído foi conduzida de acordo com metodologia previamente descrita por Rodrigues et al., (2008). Após preparação os suportes foram lavados e estocados a 4°C.

2.2.2. Imobilização

A imobilização de CALB em quitosana ativada foi realizada na presença de Triton X-100 (0,01%) em tampão bicarbonato de sodio a pH 10 (5 mM) a 25° C por 24 h, sob agitação constante. Seguido de incubação em 100 mM de tampão bicarbonato pH 10 (1:10 m/v) a 25° C, durante 24 h. Por fim, foi incubado em etilenodiamina (EDA) 1M pH 10, por 24 horas a 4 ° C. Após preparação o imobilizado foi lavado com excesso de água destilada.

2.2.3. Determinação da atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica foi realizada através da hidrólise do butirato de paranitrofenila e a concentração de *p*-nitrofenol formado foi quantificada espectrofotometricamente a 400 nm. Definiu-se 1 unidade de atividade catalítica da enzima como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de pNPB por minuto em pH 7,0 a temperatura ambiente. Os valores de rendimento de imobilização foram obtidos pela diferença entre a atividade do inicial da solução enzimática (A_{t_i}) e a atividade do remanescente ou sobrenadante (A_{t_f}). Determinou-se também a atividade do derivado (U/g) pelo slope da curva (α) em abs/minu, fator da curva de calibração do pnp em µmol/mL.abs, volume de reação (V_R) em mL e a massa do suporte (M_S) em g.

2.2.5. Hidrólise de (R,S) mandelato de metila

A hidrólise dos isômeros (R,S) mandelato de metila foi selecionada como uma reação modelo. Adicionou-se 100-200 mg do biocatalisador a 1 mL de meio reacional, contendo substrato 50 mM em diferentes tampões (100 mM): acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 e carbonato de sódio a pH 10 a 25° C, sob agitação contínua. A concentração da espécies reacionais foram analisadas por HPLC (Thermo Scientific, Finnigan Surveyor com um detector de UV PDA) utilizando uma coluna Kromasil C18 (15 cm x 0,46 cm). Amostras de 20 µL foram injetadas e eluídas a uma vazão de 1,0 mL/min utilizando acetonitrila / fosfato de amônio 100 mM (35:65 v/v) pH 2,8 como fase móvel e detecção de UV a 230 nm (Rueda et al., 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

3.1. Parâmetros de Imobilização

A Tabela 1 mostra os parâmetros de imobilização dos biocatalizadores preparados neste trabalho. Ambos apresentaram rendimento de imobilização $\geq 70\%$ e atividade recuperada maior que 35%. Esses resultados provavelmente se devem ao fato de que ambos os agentes ativadores podem reagir com diferentes porções enzimáticas, tais como: grupos amino de proteínas, tióis, fenóis e imidazóis (Santos et al., 2015 a).

Tabela 1 - Rendimento de imobilização (%), atividade do derivado (At_D) e atividade recuperada (At_R).

Biocatalisadores	Rendimento (%)	At_D (U/g)	At_R (%)
CALB-DVS-CHI	70,1 \pm 1	1,86 \pm 0,0	38,28 \pm 0,3
CALB-GLU-CHI	91,0 \pm 1	3,16 \pm 0,0	48,66 \pm 0,2

Mallin *et al.* (2014) imobilizou transaminases em quitosana ativada com glutaraldeído e atingiram rendimentos variando de 20% a 55%, aproximadamente. Quando ativaram quitosana com divinilsulfona relataram rendimentos semelhantes. O rendimento neste trabalho foi de 70,1%, superior ao obtido para as transmitases.

3.2. Hidrólise do (R,S) mandelato de metila

Os biocatalisadores produzidos foram avaliados na hidrólise dos dois isômeros a diferentes pHs (5, 7, 10) e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade específica (U/mg_{enzima}) para a hidrólise do S mandelato de metila (S-MM) e R mandelato de metila (R-MM) catalisada pelos biocatalisadores produzidos, sob diferentes condições de pH. A atividade é dada em U por mg de enzima imobilizada.

Substrato	CALB-DVS-QUI			CALB-GLU-QUI		
	pH 5	pH 7	pH 10	pH 5	pH 7	pH 10
R-MM	15.24 \pm 0.7	15.54 \pm 2.3	25.77 \pm 0.5	5.58 \pm 0.1	6.57 \pm 0.0	6.57 \pm 0.0
S-MM	17.63 \pm 0.1	16.67 \pm 0.0	22.72 \pm 0.6	4.63 \pm 0.0	5.20 \pm 0.0	5.16 \pm 0.1
R/S*	0.87 \pm 0.0	0.93 \pm 0.1	1.13 \pm 0.0	1.21 \pm 0.0	1.26 \pm 0.0	1.27 \pm 0.0

* razão enantiomérica (R/S)

Como pode ser observado na Tabela 2, a CALB imobilizada em quitosana, seguindo os dois protocolos de ativação, apresentou diferentes atividades específicas o que indica que os biocatalisadores podem ter diferentes orientações e/ou graus de interação enzima-suporte. No entanto, não foi observado uma variação significativa na atividade dos biocatalisadores quando o pH do substrato foi variado. A razão enantiomérica (R/S), dos dois biocatalisadores apresentaram valor insignificante, que foi quase mantido inalterado mostrando que não houve seletividade por nenhum isômero. Esses resultados foram inesperados, uma vez que Santos *et al.* (2015 b), imobilizou CALB em agarose ativada com divinilsulfona e obteve relação enantiomérica R/S de 5,4 \pm 1,6, 7,3 \pm 1,7 e 8,0 \pm 1,5 nos pH 5, 7 e 9, respectivamente.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o novo suporte DVS-QUI tem potencial para ser utilizado na imobilização de lipases. Assim, o uso de divinilsulfona durante o processo de ativação da quitosana abre uma nova linha de pesquisa, permitindo a modulação das interações de suporte à lipase visando otimizar as propriedades biocatalizadoras.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, sem o qual a realização do trabalho não seria possível.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57(1), p. 19–34. 2004.

Mallin, H., Höhne, M., & Bornscheuer, U. T. Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. *Journal of Biotechnology*, v. 191, p. 32–37. 2014.

Mendes, A. A., De Castro, H. F., Andrade, G. S. S., Tardioli, P. W., & Giordano, R. D. L. C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *Reactive and Functional Polymers*, v. 73, p. 160–167. 2013.

Rodrigues, D. S., Mendes, A. A., Adriano, W. S., Gonçalves, L. R. B., & Giordano, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100–109. 2008.

Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Torres, R., Ortiz, C., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Adv.*, v. 5, p. 11212–11222. 2015.

Rueda, N., Santos, J. C. S. dos, Ortiz, C., Barbosa, O., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. *Catalysis Today*, v. 259, p. 107–118. 2016.

Santos, J. C. S., Rueda, N., Torres, R., Barbosa, O., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 918–927. 2015. (a)

Santos, J.C.S. dos; Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 77, p. 1–7, 2015. (b)