



Área: Engenharia de alimentos

INCORPORAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO NA ESTRUTURA MOLECULAR DO POLIURETANO (EPU) PARA REALIZAÇÃO DE LIGAÇÃO ENZIMÁTICA COVALENTE

Andressa Franco Denti^{1*}, Julia Lisboa Bernardi¹, Carolina Elisa Demaman Oro¹, Tiago dos Santos Gonçalves¹, Ana Paula Dariff¹, Alexander Junges¹, Rogério Marcos Dallago¹, Luciana Dornelles Venquiaruto¹

¹ Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), 99709-910, Erechim, RS.

*E-mail: andressa.franco98@hotmail.com

RESUMO – As enzimas são biocatalisadores utilizados na produção de diversos produtos. A fim de aumentar a sua vida útil e sua estabilidade frente a diferentes condições de pH e temperatura, a imobilização enzimática torna-se uma alternativa atrativa. Na imobilização enzimática pode-se utilizar diferentes suportes, dependendo do processo, características da enzima e do reator. Nesse contexto, a busca por um suporte onde ocorra uma forte ligação com a enzima é desejável. Assim, o presente tem como objetivo a modificação do suporte de poliuretano (EPU) através da incorporação química do glutaraldeído na estrutura molecular do EPU para que este possa realizar processos de imobilização enzimática por ligação covalente. Os mecanismos envolvidos na reação de incorporação para imobilização por ligação covalente utilizando como suporte o poliuretano foram elucidados e testados através de diferentes formulações, evidenciando diferenças visuais nas espumas conforme foi aumentada a proporção de glutaraldeído.

Palavras-chave: Imobilização covalente, enzimas, poliuretano, glutaraldeído.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas capazes de acelerar uma reação metabólica através de seu poder de catálise, o qual é essencial para a manutenção da vida. Com o rápido desenvolvimento da enzimologia e aumento da demanda por enzimas específicas para usos comerciais, surgiu o mercado industrial de enzimas. As enzimas mais comercializadas são as proteases, carboidrases e lipases, sendo utilizadas principalmente nas indústrias de alimentos, ração animal e detergentes (Nelson e Cox, 2014).

Dessa forma, as lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma importante classe de enzimas, cujo papel fisiológico é o de hidrolisar triacilgliceróis, formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres, bem como sintetizar novos triacilgliceróis através da esterificação e transesterificação de ácidos graxos de cadeias longas, sendo altamente seletivas. Assim, são biocatalisadores aplicáveis à produção de diversos produtos (Zanette *et al.*, 2014).

Destacam-se entre as principais enzimas usadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos (Kapoor e Gupta, 2012).

Enzimas imobilizadas são definidas como biocatalisadores que estão contidos ou localizados em um microambiente conservando suas propriedades catalíticas. Portanto, a imobilização é um método utilizado para a manutenção da estabilidade das enzimas, tornando-as mais atrativas para a indústria (Moreno-Pirajan e Giraldo, 2011).

As técnicas e as condições empregadas durante a imobilização, como o tipo de suporte, tipo de ligação, natureza do solvente e variações de reatores podem influenciar nas propriedades, que podem ser moldadas de acordo com cada tipo de reação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Novas metodologias/processos de imobilização, bem como novas aplicações industriais têm sido frequentemente relatados na literatura (Zanin e Moraes, 2004), com destaque para as que conseguem imobilizar a enzima *in situ*, durante a etapa de síntese do suporte, como no caso do suporte de poliuretano.

A imobilização enzimática em espuma de poliuretano (EPU) ocorre em duas fases, onde a primeira fase é de dispersão dos reagentes (poliol e isocianato), sendo a adição da enzima realizada ao poliol. Em seguida ocorre a segunda fase, a de nucleação, onde as bolhas de ar são introduzidas durante a etapa de mistura dos reagentes (Vilmar, 2013).

No entanto, durante os estudos constatou-se que para algumas enzimas o processo conduzia a inativação da enzima quando empregada em solução (Bustamante-Vargas *et al.*, 2015), devido a etapa de polimerização ser exotérmica, e também comprometia as etapas de reciclo (Dallago *et al.*, 2016, Khun, *et al.*, 2013, Nyari *et al.*, 2013, 2017 e 2018, Bustamante-Vargas *et al.*, 2015), sugerindo que a enzima se encontrava imobilizada por confinamento ou via interações fracas, permitindo sua lixiviação do suporte durante as etapas de reciclo.



Neste contexto, se justifica a realização da presente proposta, a qual pretende melhorar o processo de imobilização, conduzido a imobilizados mais estáveis através de ligações covalentes com o suporte.

Na imobilização por ligação covalente, a enzima é covalentemente ligada a um material insolúvel, em água, pela reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos do material ativado. Esta técnica apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste caso, são envolvidos os resíduos de aminoácidos não essenciais à catálise enzimática e grupos reativos da superfície do suporte. Entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação encontram-se: grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico; grupos amino da lisina e da hidroxilisina; hidroxila da serina e outros (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Ferraz, 2014).

Para uma interação mais forte da enzima com o suporte, este necessita ser modificado através da funcionalização e ativação do mesmo com glutaraldeído. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de incorporar quimicamente o glutaraldeído na estrutura molecular do EPU para que este possa realizar processos de imobilização enzimática por ligação covalente, entre o grupo aldeído (-CHO) do suporte com os grupos aminas (-NH₂) terminais das enzimas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese do suporte de poliuretano funcionalizado com glutaraldeído

Os monômeros comerciais Polioli e Isocianato, utilizados no presente trabalho para a formação da espuma de poliuretano (EPU), foram gentilmente cedidos pela Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes.

Para a síntese do suporte de poliuretano com adição de glutaraldeído, foram utilizadas as proporções descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Proporções de reagentes utilizados para a síntese do suporte de poliuretano funcionalizado com glutaraldeído.

Reagentes	Espuma sem glutaraldeído (Branco)	Espuma 1G	Espuma 2G	Espuma 3G	Espuma 4G
Polioli (mL)	7	7	7	7	7
Isocianato (mL)	4	3,5	4	4,5	5
Glicerina (mL)	1	-	-	-	-
Mistura (1:1) em volume de glicerina e glutaraldeído (mL)	-	1	2	3	4

As substâncias presentes no meio reacional com possibilidade de que o glutaraldeído tenha interação são: álcool (polioli), isocianato como reagentes, produtos da reação principal do EPU e da reação secundária além do próprio EPU.

Aldeídos podem reagir com álcool e com a amina secundária que está presente no grupo uretano (polioli + isocianato) da formação do PU, onde será revisado as condições e consequências destes mecanismos reacionais (Morrison e Boyd, 2011).

O aldeído (carga parcial negativa) precisa de nucleófilos para reações de adição nucleofílica no carbono da carbonila assim como o isocianato, portanto podemos concluir que aldeídos não reagem com isocianatos por apresentarem a mesma característica de carga negativa em reações (Morrison e Boyd, 2011).

Já o grupo carbonila (C=O) é polar porque o oxigênio, sendo mais eletronegativo do que o carbono, tem maior participação nos elétrons da ligação dupla. Portanto a carga parcial positiva do carbono da carbonila (α) favorece os ataques nucleofílicos por duas razões (Bruice, 2006):

- Fornecer local para a adição nucleofílica;
- Aumentar a acidez dos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono α .

Um aldeído dissolvido em um álcool formará uma mistura de equilíbrio contendo o hemiacetal correspondente tanto em meio ácido, por meio da reação de adição da molécula nucleofílica de álcool ao grupo carbonila (Bruice, 2006; Morrison e Boyd, 2011; Vollhardt e Schore, 2014).

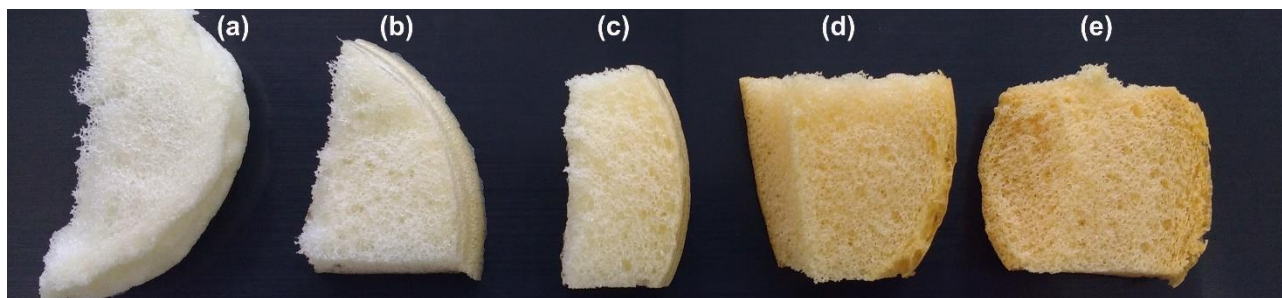
Se esta reação acontecer com um álcool de funcionalidade igual a dois, o produto resultante desta reação realizará a terminação do processo de polimerização. Para diminuir este possível desvio, pode-se utilizar glicerina (triol) para a produção deste hemiacetal, que apresentará ainda funcionalidade igual a 2, passível de continuar a reação de polimerização do PU, sem comprometer o objetivo de obter pontos reativos no PU para imobilização por ligação covalente.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as espumas um dia após a síntese do suporte. É possível notar uma nítida diferença de coloração, a qual foi aumentando ao decorrer do tempo de estocagem. Esse mecanismo é similar ao do escurecimento não enzimático de alimentos (Reação de Maillard), processo esse que resulta no escurecimento sob aquecimento por causa da reação exotérmica do PU (Vilar, 1999) ou durante a estocagem, com o glutaraldeído comportando-se como um açúcar redutor reagindo com a amina secundária do PU que simularia uma proteína para a realização da Reação de Maillard, mecanismo de escurecimento não enzimático. Então condições de temperatura, tempo de estocagem e concentração de glutaraldeído terão influência na cor produzida por esta cor (Damodaran, Parkin e Fennema, 2010).

Figura 1. Em (a) a Espuma em Branco (sem adição de glutaraldeído), em (b) a Espuma 1G, em (c) a Espuma 2G, em (d) a Espuma 3G e em (e) a Espuma 4G.



A reação entre a amina (NHR) do PU e o glutaraldeído (carbonila - COH) reagem liberando uma molécula de água e produzindo compostos parecidos com uma base de Schiff, que submetida a uma reação chamada de rearranjo de Amadori (aldose) e Heyns (cetose), reações fortemente influenciadas pela acidez do meio reacional (Bobio e Bobio, 2001).

Ocorrendo uma das duas reações descritas acima (reações com álcool ou com mecanismo similar ao de Maillard), o glutaraldeído estará ligado quimicamente a estrutura da EPU, possibilitando a sua funcionalização necessária para o processo de imobilização enzimática por ligação covalente. Como o grupo carbonila presente no glutaraldeído é muito reativo, o mesmo pode realizar reações de ligação cruzada na estrutura do PU, perdendo assim um ponto de ligação com a enzima, e o mecanismo mais provável de reação do glutaraldeído com a EPU será observado com os dados cinéticos de imobilização de enzimas, onde a proporção de reagentes obter maior imobilização será aquela em que o glutaraldeído tem apenas uma ligação covalente com a estrutura do EPU.

4 CONCLUSÃO

Os mecanismos envolvidos na reação de incorporação para imobilização por ligação covalente utilizando como suporte o poliuretano foram elucidados e testados, evidenciando diferenças visuais nas espumas. Para a reação de imobilização da enzima (grupos amina primária) com o glutaraldeído como agente de ligação com a espuma (aldeído), dados cinéticos informarão quais são as melhores condições (proporção dos reagentes, pH e temperatura).

5 AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Código Financeiro 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS, Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e a Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI.

6 REFERÊNCIAS

- Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. 2001. *Química do processamento de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001.
- Bruice, P. Y. 2006. *Química orgânica*. v.2. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall.
- Bustamante-Vargas, C. E.; Dallago, R. M.; Oliveira, D.; Nyari, N. L. D.; Valduga, E.; Soares, M. A.; Toniazzo, G. 2015. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v.122, p.35 – 43.
- Dallago, R. M., Nyari, N. L. D.; Fernandes, I. A.; Vargas, C. E. B.; Steffens, C.; Zeni, J.; Oliveira, D.; Rigo, E. 2016. In situ immobilization of Candida antarctica B lipase in polyurethane foam support. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. v.124, p.52 – 61.



- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. 2004. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630.
- Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. 2010. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Ferraz, L. I. R. *Aplicação de lipases na catálise de reações de interesse*. 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.
- Kapoor, M.; Gupta, M. N. 2012. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 503-508.
- Kuhn, G.; Golunski, S. M.; Silva, M. F.; Dallago, R. M.; Rosa, C. D.; De Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; Treichel, H. 2013. Inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano e pré-tratada em GLP pressurizado na síntese de FOS. In: *XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Foz do Iguaçu.
- Moreno-Pirajan, J.C.; Giraldo, L. 2011. Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 4, p.55-62.
- Morrison, R. T.; Boyd, R.; N. 2011. *Química Orgânica*. 16. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1298 p.
- Nyari, N. L. D.; Zeni, J.; Zannatta, J.; Fernandes, I.; Moreira, A. M.; Dallago, R. M.; Rigo, E. 2013. Estabilidade térmica da lipase de *Candida antarctica* B livre e imobilizada em poliuretano. In: *10 SLACA- Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos*, Campinas- SP.
- Nyari, N. L. D.; Paulazzi, A. R.; Steffens, C.; Mignoni, M.; Zeni, J.; Dallago, R. M. 2017. Optimization of olive oil hydrolysis process using immobilized Lipase from *Burkholderia cepacia* sp. in Polyurethane. *Acta Scientiarum. Technology (Online)*. v.39, p.385.
- Nyari, N. L. D.; Zabet, G. L.; Zamadei, R.; Paluzzi, A. R.; Tres, M. V.; Zeni, J.; Venquiaruto, L. D.; Dallago, R. M. 2018. Activation of *Candida antarctica* lipase B in pressurized fluids for the synthesis of esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.93, p.897 - 908, 2018.
- Vilar, W. D. 1999. *Química e Tecnologia dos Poliuretanos*, 2. ed., Rio de Janeiro: Vilar Consultoria.
- Vilmar, W.D., 2013. *Química Tecnológica dos poliuretanos*. Rio de Janeiro.
- Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. 2004. *Química Orgânica: estrutura e função*, 4. ed. Porto Alegre: Bookman.
- Zanette, A. F.; Awadallak, J.; Filho, L.C. 2014. Imobilização de lipases regiosseletivas em matrizes sol-gel e reação parcial de hidrólise. *Journal of Exact Sciences*, v.3, n.1, p.05- 08.
- Zanin, G. M.; Moraes, F. F. 2004. *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*, Ribeirão Preto, Ed. Legis Summa, cap. 4, p. 35-85.

7 AVISO DE RESPONSABILIDADE

Os autores são os únicos responsáveis pelo material impresso incluído neste papel.