

## Área: Engenharia de Alimentos

# IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Candida antarctica* B EM POLIURETANO ARMAZENADA À ALTAS TEMPERATURAS

Nádia Ligianara D. Nyari\*, Aline M. Moreira\*, Ilizandra A. Fernandes\*, Jamile Zeni\*,  
Lenir I. R. Ferraz\*, Rogerio M. Dallago\*, Elisandra Rigo\*\*

\*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos,  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões- Erechim, RS.

\*\*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de  
Engenharia de Alimentos Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhauzinho, SC.

\*E-mail: nadialigianara@yahoo.com.br

**RESUMO** – A imobilização e estabilização das enzimas é uma das etapas mais importantes para o desenvolvimento de novos catalisadores, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso industrial das enzimas, tornando-as catalisadores ideais para processos específicos. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a imobilização da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) por confinamento em matriz de poliuretano. Avaliaram-se a concentração dos monômeros (poliol e isocianato) na preparação da matriz e a estabilidade da enzima imobilizada em diferentes temperaturas, medindo-se as atividades residuais de síntese de oleato de etila. Os resultados indicaram que a concentração dos monômeros de 75/25 % (poliol e isocianato) foi a melhor por fornecer uma espuma mais flexível, sendo esta usada para imobilizar a enzima. A enzima imobilizada permaneceu estável quando submetido às altas temperaturas (40 °C, 60 °C e 80 °C) permanecendo com atividade de 59 % a 40 °C e 58 % a 60 °C em 150 dias, e 78 % à 80 °C em 80 dias de estocagem com atividade de 70 % a 40 °C e 50 % a 60 °C em 120 dias e 100 % à 80 °C em 45 dias de estocagem. Estes resultados evidenciam a eficiência da imobilização no aumento da estabilidade da CAL B, considerando que esta na forma livre submetida a altas temperaturas, foi totalmente inativada após 2 horas a 80 °C, 12 horas a 60 °C e 24 horas a 40 °C ressaltando a sua fragilidade.

**Palavras-chave:** Imobilização, Lipase, Poliuretano.

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da preocupação com questões ambientais, qualidade do produto e redução de gastos em setores industriais, alavancou o interesse pelo uso de enzimas. A tecnologia enzimática é uma alternativa que visa substituir os processos químicos, uma vez que os biocatalisadores envolvem processos com menor impacto

ambiental e são mais específicos, apresentando-se como uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases constituem um grupo importante de biocatalisadores devido a características de obtenção, alta seletividade e por possibilitar uma tecnologia de grande importância biotecnológica, econômico e industrial de baixo impacto ao meio ambiente (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Ainda ressalta-se a capacidade das lipases em catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado, resultando em amplo potencial de aplicação, relacionado à sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e possuir quimio-regio e em antiosseletividade (KAPOOR *et al.*, 2012).

Os setores industriais que mais se utilizam de lipases para geração de bens de consumo são: o de formulação de detergentes, degradação de óleos e gorduras, síntese farmacêutica, produção de cosméticos, manufatura de fermento, queijo, papéis e couro, tratamento de efluentes, produção de biodiesel, kits para diagnósticos em análises clínicas dentre outras (MACHADO, 2011; WANDERLEY *et al.*, 2011; ABDELMAJEED *et al.*, 2012).

Assim, nos últimos anos, pesquisadores têm mostrado interesse na lipase de *Candida antarctica*, devido a suas propriedades, como a termoestabilidade e estabilidade em pHs ácidos (UPPENBERG *et al.*, 1994). Portanto, a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, possibilitando produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições do uso das enzimas em processos industriais (ZANIN *et al.*, 2004).

A escolha de um biocatalisador imobilizado está relacionada com a possibilidade de aplicação, atividade catalítica, viabilidade de operação contínua do processo, maior facilidade de controle e de separação do produto final, aumento de estabilidade ao meio reacional, pH e à temperatura (MENDES *et al.*, 2011). Além de facilitar à separação de produtos, de processo um processo contínuo estabilização da enzima, custos com manejo de materiais minimizados, propriedades enzimáticas alteradas favoravelmente e a ocorrência de um aumento na atividade da proteína (BRÍGIDA 2006; ARAUJO 2009).

Os poliuretanos têm sido investigados para utilização como suportes enzimáticos principalmente em reações em meio orgânico, onde a enzima fica retida na estrutura porosa da matriz. Por possuir certa flexibilidade e uma infinita variedade de compostos diferentes de propriedades físicas, químicas e morfológicas de acordo com necessidades específicas de aplicação fazendo com que os PU ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (SANTOS, 2011; ALBIQUIM, 2013).

Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a imobilização da lipase de *Candida antarctica* do tipo B em poliuretano (PU), verificando a concentração dos monômeros que resulte em um suporte apropriado, bem como a estabilidade térmica da enzima

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) de alta qualidade adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda.

Os monômeros comerciais Polioli e Isocianato utilizados nesse trabalho, foram produzidos com uma formulação específica para colchões e espumas injetadas pela Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes.

## 2.2 Métodos

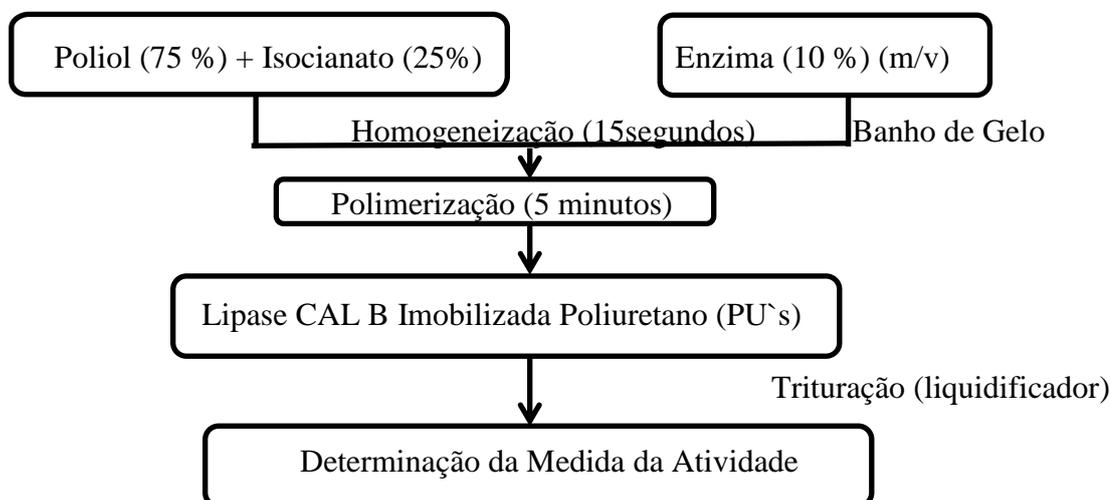
### *Polimerização dos monômeros:*

O polímero poliuretano foi preparado de acordo com metodologia de SILVA *et al.* (2013) modificado. Diferentes concentrações dos monômeros (polioli e isocianato) foram avaliadas em 8 ensaios variando-se as proporções dos mesmos. Este procedimento foi realizado com o auxílio de duas seringas descartáveis e um recipiente de poliestireno (200 mL), para posterior mistura dos monômeros.

### *Imobilização da lipase:*

Preparou-se uma solução enzimática (0,6 % de CAL B liofilizada) em água, com atividade inicial de 1020 U/mL. Como podemos observar no fluxograma da Figura 1 o imobilizado foi produzido pela mistura da enzima em solução (correspondendo a 10 % do volume total dos monômeros) em polioli e isocianato.

**Figura 1** Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da lipase CAL B em PU.



O rendimento de imobilização foi calculado considerando a atividade total da enzima livre (12,8 mg) empregada na imobilização e a atividade total do derivado (CAL B imobilizada em PU) obtido (8,0 g) (SILVA, *et al.* 2013). A recuperação de atividade foi de 250 % (relação entre atividade medida na enzima imobilizada e atividade teórica). Esse comportamento pode ser devido à ativação da molécula de enzima imobilizada (lipase imobiliza-se com a tampa aberta na presença de superfícies hidrofóbicas) e/ou quebra de aglomerados bimoleculares que podem estar presentes na solução de enzima solúvel. Se o suporte for altamente hidrofóbico esses aglomerados (menos ativos) são desfeitos e, portanto, a enzima monomolecular imobilizada é mais ativa.

#### *Estabilidade térmica:*

A estabilidade térmica da CAL B imobilizada em PU foi investigada a temperatura de 40, 60 e 80 °C, incubando-se, a seco, a enzima imobilizada em frascos de polipropileno com tampa. A estabilidade foi avaliada no decorrer do período avaliado.

#### *Dosagem da atividade de esterificação:*

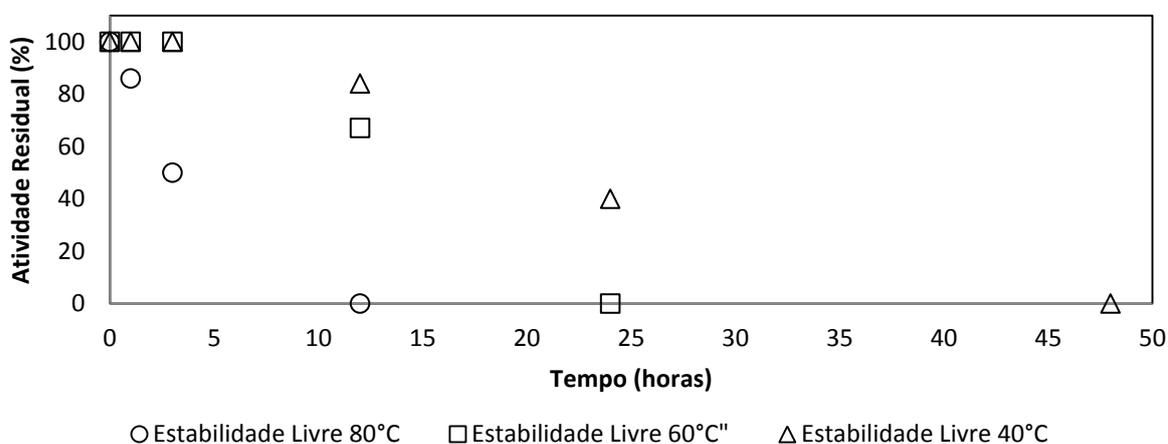
A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul *et al.*, 2011), onde misturou-se álcool geraniol e ácido oleico na proporção molar de 3:1. A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, esta foi iniciada pela adição da CAL B livre (0,1g da solução enzimática) e/ou da enzima imobilizada em PU (0,1 g) ao meio reacional (5 mL), em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v).

Os brancos reacionais também foram quantificados, retirando no início da reação. A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M até pH 11.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

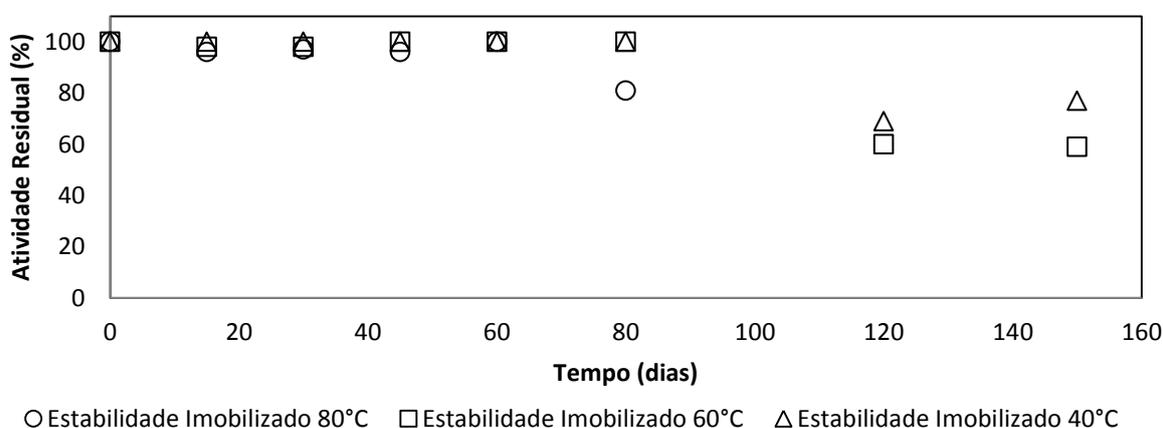
Os resultados de polimerização do poliuretano mostraram que a proporção dos monômeros poliol e isocianato de 75/25 (% v/v) conduziram à formação de uma espuma com estrutura polimérica homogênea, de boa maleabilidade, estabilidade quanto à retração do volume, e boa conformação estrutural e distribuição de poros. A Figura 2 mostra que a atividade de esterificação da enzima livre incubado nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C.

**Figura 2 Atividade de esterificação da enzima livre incubada nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C.**



Os resultados evidenciam que a enzima na forma livre obteve um decaimento de 50 % após 2 horas em contato a temperatura de 80 °C, 67 % em 12 horas a 60 °C e 40 % em 24 horas a 40 °C ressaltando a sua fragilidade. A Figura 3 mostra que a atividade de esterificação da enzima imobilizada incubado nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C. O derivado CAL B-PU (lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano) permaneceu estável quando submetido às altas temperaturas (40 °C, 60 °C e 80 °C) permanecendo com atividade de 59 % a 40 °C e 58 % a 60 °C em 150 dias, e 78 % à 80 °C em 80 dias de estocagem. Comprovando assim, a eficiência da imobilização em relação esta na forma livre submetida a altas temperaturas. Esses resultados mostram que o suporte poliuretano é adequado à imobilização de lipase de *Candida Antarctica* B, produzindo um derivado estável à estocagem e à alta temperatura.

**Figura 3 Atividade de esterificação do derivado incubado nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C.**



## 4 CONCLUSÃO

A exposição a altas temperaturas resultou estável quando submetido às altas temperaturas (40 °C, 60 °C e 80 °C) permanecendo com atividade de 59 % a 40 °C e 58 % a 60 °C em 150 dias, e 78 % à 80 °C em 80 dias de estocagem. Estes resultados demonstram que a utilização de espumas de poliuretano, como suporte, na imobilização de enzimas, resulta em um aumento na estabilidade, mostrando que esse biocatalisador poderia ser aplicado na síntese contínua de ésteres utilizando-se reatores de leito fixo.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, FAPERGS e URI pelo apoio financeiro e bolsas de estudos disponibilizadas para a realização deste trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABDELMAJEED, N.; KHELI, O.; DANIAL, E., **Immobilization technology for enhancing bio-products industry**, *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.
- ALBIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química, disponível em: <http://ebiquim.org.br/poliuretanos/quimicamente.htm>, acesso em 20 de fevereiro de 2013.
- ARAUJO, L. T. C de, **Aplicações de Lipases**, Monografia apresentada ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2009.
- BRÍGIDA, A.I.S., **Estudo da Imobilização de lipase do tipo B de *Cândida antarctica* utilizando fibras da casca de côco verde como suporte**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N., **Lipase promiscuity and its biochemical applications**, *Process Biochemistry*, 48:1-15, 2012.
- MACHADO, A. C. O., **Obtenção de Intermediários Quirais Utilizando Lipases em Reatores Assistidos por Membranas**, Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rio de Janeiro, dezembro de 2011.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C., **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**, *Quim. Nova*, v. 34 (5), p. 831-840, 2011.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A., **Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações**, *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, p.97-109, ISSN:1980-0002, Artigo de Revisão, setembro-dezembro, 2012.
- PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 323-329, 2011.
- SANTOS, R. D., **Produção Enzimática de Poli( $\epsilon$ -Caprolactona) em Dióxido de Carbono Supercrítico**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2011.
- SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H., **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam**, *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 54-59, 2013.
- UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T., **Alwyn.Crystilization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica***. *J. of Molecular Biology*, v. 235 (2), p. 790-792, 1994.
- WANDERLEY (a), M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, J de C., **Revisão Aspectos da Produção Industrial de Enzimas**, *Revista Citino*, Vol. 1, No. 1, 30-36, 2011.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F.F., **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**, Ribeirão Preto, Ed. Legis Summa, cap. 4, p. 35-85, 2004.