

Área: Engenharia de Alimentos

AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Candida antarctica* B EM ESPUMA DE POLIURETANO

Nadia L.D. Nyari^{a*}, Ilizandra A. Fernandes^a, Diane Rigo^a, Juliana da S. Zanatta^a, Aline M. Moreira, Jamile Zeni^a, Rogério M. Dallago^a, Débora de Oliveira^b, José Vladimir de Oliveira^b, Elisandra Rigo^c

^aLaboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, URI- Erechim, RS

^bLaboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

^cLaboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, SC

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

RESUMO – A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, considerando que ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens dos biocatalisadores acaba sendo eliminada e as enzimas podem ser utilizadas em processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização da lipase *Candida antarctica* B (comumente denominada CalB) utilizando espuma de poliuretano (PU) como suporte. A estabilidade do derivado enzimático frente à temperatura (40, 60 e 80 °C) e a estabilidade à estocagem (4 e 25 °C) foi também avaliada. Os resultados obtidos indicaram que a razão entre os monômeros polioliol:isocianato 5:3 (v/v) foi a melhor para imobilização da lipase de *Candida antarctica* B. O derivado enzimático obtido manteve sua atividade inicial após 21 horas de exposição nas altas temperaturas. O armazenamento a baixas temperaturas permitiu verificar a manutenção da atividade enzimática do derivado enzimático durante 74 dias, tanto na forma fracionada como triturada.

Palavras-chave: Imobilização, poliuretano, lipase, esterificação, estabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Poliuretanos são amplamente utilizados em vários campos, tais como a produção de espumas de plástico, almofadas, artigos de borracha, couro, adesivos, tintas e fibras. Estas espumas podem ser consideradas promissoras para uso como suportes para imobilização de enzimas para uso em reações em meios orgânicos, considerando que possuem propriedades únicas tais como a resistência a óleos, solventes e gorduras (GUNCHEVA *et al.*, 2011).

As vantagens do uso de lipases imobilizadas em processos de esterificação são amplamente relatadas na literatura, considerando que esta proporcionaria a elevação dos rendimentos do éster sob suaves condições de operação, dispensando etapas posteriores de purificação (GARCIA *et al.*, 2002). Esta tendência é vislumbrada para as reações de síntese enzimática para produção de ésteres aromáticos naturais, sendo a lipase o biocatalisador. Normalmente a indústria química sintetiza os aromatizantes e flavorizantes usando catalisadores químicos os quais, geralmente, levam à formação de subprodutos indesejáveis, e alto consumo de energia, assim a síntese enzimática surge como uma possibilidade de superar estes inconvenientes, e para tornar o processo ambientalmente favorável (CHIARADIA *et al.*, 2011).

Com base nestes aspectos, o presente trabalho tem como objetivo central avaliar o efeito de parâmetros de imobilização da lipase CalB pelo método de confinamento, utilizando como suporte a espuma de poliuretano obtidas através da polimerização dos monômeros poliol e isocianato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

A imobilização foi realizada utilizando a lipase solúvel de *Candida antarctica* do tipo B livre (Novozyme NZL-102, Cal B), adquirida na forma líquida da empresa Novozymes Latin América Ltda. A enzima CalB líquida foi previamente diluída em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, na proporção 1:10 (v/v) (enzima:tampão).

Os monômeros comerciais poliol e isocianato, foram produzidos com uma formulação específica para colchões e espumas injetadas, pela Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes.

2.2 Polimerização dos Monômeros

A reação de polimerização para obtenção do poliuretano foi realizada variando a razão dos monômeros poliol:isocianato (5:2, 5:3, 5:4, 5:5 e 3:5 (v/v)). Esta variável foi definida com base no trabalho de Silva *et al.* (2013) modificado.

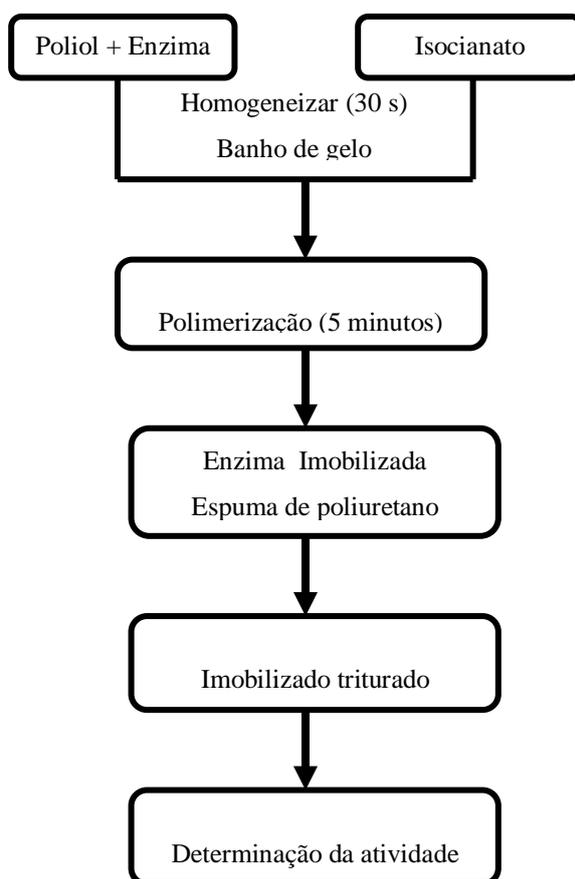
2.3 Imobilização da lipase utilizando poliuretano como suporte

O procedimento experimental para imobilização da CalB em PU foi realizada pela avaliação da formação do polímero na concentração dos monômeros selecionada em etapa anterior (razão 5:3) adicionado da enzima CalB diluída.

A imobilização foi conduzida adicionando 10% do volume de *Candida antarctica B* diluída aos monômeros. Para a imobilização, a enzima foi homogeneizada no monômero poliol e no isocianato, sendo o

recipiente mantenedor da mistura envolto em banho de gelo, buscando evitar o aumento excessivo da temperatura devido à reação exotérmica gerada pela mistura dos monômeros, de acordo com o esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1- Apresentação esquemática do procedimento para imobilização da lipase CalB em PU.



Após a etapa de polimerização, o poliuretano contendo a enzima (imobilizado) foi mantido durante 24 horas em dessecador para equalização do teor de umidade.

Decorrida a polimerização a estrutura formada com a enzima inclusa foi dividida em duas parcelas verticais e três horizontais. As frações foram testadas individualmente, para identificar a distribuição da lipase no processo de imobilização em todas as partes da espuma. A dosagem da atividade foi realizada em cada fração, em seguida todas as parcelas foram misturadas, onde determinou-se novamente a atividade em ácido oleico, sendo este considerado o total do imobilizado (100%) .

2.4 Estabilidade da enzima livre e imobilizada a alta e baixa temperatura

A enzima livre e imobilizada em PU foi mantida em estufa a vácuo a 40, 60 e 80 °C por 21 horas, segundo metodologia descrita por Silva *et al.* (2012), modificada. A CalB imobilizada em PU, fracionada e triturada, foi armazenada em geladeira (4 °C) em frascos de vidro (sem presença de tampão). A exposição à

temperatura ambiente (25 °C) também foi avaliada para a CalB/PU fracionada e triturada. Periodicamente, efetuava-se a dosagem da atividade de esterificação com ácido oleico e etanol.

2.5 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação das lipases nas diferentes formas de apresentação foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1 (v/v)). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição da enzima (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico (FERRAZ *et al.*, 2012 modificada). A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Maximização das condições de polimerização para imobilização da lipase em PU

As diferentes razões polioli:isocianato testadas apresentaram comportamentos distintos. Na razão molar 5:2 não houve polimerização, 5:3 obteve-se uma espuma uniforme flexível, a razão de 5:4 conduziu à formação de uma espuma com grandes poros, 5:5 a espuma ficou oca e na razão 3:5 a espuma permaneceu úmida ao final do processo. A escolha dos monômeros (diisocianatos e polióis) empregados na formação da espuma, cada um com suas características próprias e funcionalidades, também podem interferir na qualidade destas espumas (MENG *et al.*, 2008).

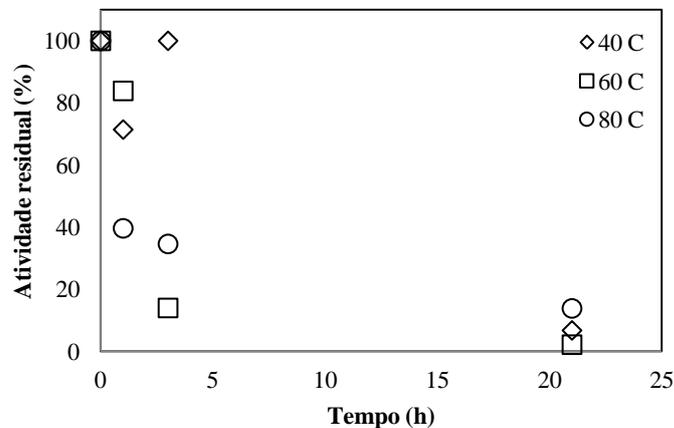
A avaliação das condições de imobilização permitiu identificar que na razão 5:3 (v/v) de polioli/isocianato ocorreu a formação de uma espuma mais flexível com poros uniformes. A espuma formada apresentou uma boa uniformidade na estrutura polimérica, o que indica que ocorreu imobilização da enzima.

A atividade de esterificação da CalB livre e imobilizada em PU foi de 104 U/mL e 172,91 U/g, respectivamente. A enzima não sofreu desnaturação, sendo verificado, inclusive, um aumento na atividade da enzima imobilizada neste suporte. Cumpre mencionar que este processo é rápido e retém atividade enzimática, conforme apresentado anteriormente no trabalho de Silva *et al.* (2013), os quais avaliaram a imobilização da inulinase de *Aspergillus niger*.

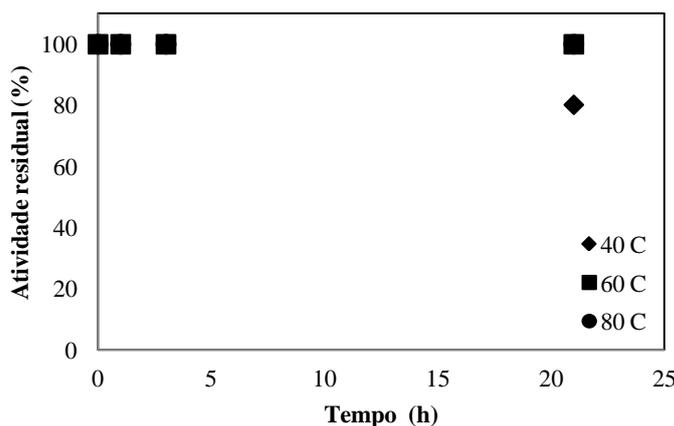
3.2. Estabilidade térmica da CalB livre e derivado imobilizado

A avaliação da estabilidade da enzima livre e imobilizada em função do tempo de exposição a diferentes temperaturas, estão apresentados na Figura 2A (CalB livre à altas temperaturas) e 2B (CalB imobilizada em PU à altas temperaturas).

Figura 2 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB livre (A) e imobilizada (B) como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).



(A)



(B)

Após 21 horas de exposição observou-se que a atividade da enzima livre submetida à temperatura de 40 °C não apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 100%. Na temperatura de 60 °C, uma queda na atividade foi observada, conduzindo a uma atividade residual de 6,74%, conforme apresentado na Figura 2A. A alta temperatura degrada rapidamente a enzima livre, esse fato foi confirmado na temperatura de 80 °C, quando a atividade residual, após 21 horas de exposição, foi de 2,14%.

Em relação à estabilidade do derivado imobilizado submetido à temperatura de 40°C, durante as primeiras 3 horas este permaneceu com a atividade constante, não demonstrando queda. Após 21 horas de exposição observou-se que a atividade da enzima imobilizada submetida à temperatura de 60 e 80 °C não apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 100%, conforme mostra a Figura 2B.

A estabilidade da enzima CalB imobilizada em PU mantida a baixa temperatura, tanto na forma triturada quanto fracionada, apresentou comportamento instável. Este comportamento observado requer um estudo mais aprofundado, pois a ocorrência de reações durante o armazenamento é possível. A estabilidade da CalB imobilizada em PU foi de 74 dias tanto na forma triturada como fracionada.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram que a razão entre os monômeros poliol:isocianato 5:3 (v/v) foi a melhor para imobilização da lipase de *Candida antarctica* B. O derivado enzimático obtido manteve sua atividade inicial após 21 horas de exposição nas altas temperaturas. O armazenamento a baixas temperaturas permitiu verificar que tanto na forma fracionada como triturada, não a interferência na atividade da enzima CalB imobilizada em PU.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a À URI – Erechim, CAPES e CNPq pela infra-estrutura e suporte financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- CHIARADIA, V.; DETOFOL, M.; CANSIAN, R. L.; DALLAGO, R. M.; OLIVEIRA, D.; PAROUL, N. Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livre de solvente. **Revista Perspectiva**, v. 131 (35), p. 35-42, 2011.
- 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.
- GARCIA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 1411-1423, 2002.
- GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 923-930, 2011.
- MENG, Q.; HU, J.; MONDAL, S. Thermal sensitive shape recovery and mass transfer properties of polyurethane/modified MWNT composite membranes synthesized via *in situ* solution pre-polymerization. **Journal of Membrane Science**, v. 319, p.102-110, 2008.
- SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.
- 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.