

## Área: Engenharia de Alimentos

# OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB EM XEROGEL OBTIDO PELA TÉCNICA SOL-GEL UTILIZANDO TMOS COMO PRECURSOR DE SÍLICA

**Aline Matuella M. Ficanha\***, Angela Antunes, Mateus Bopsin, Katarine Lia Levandoski,  
Cícero José Matuella Moreira, Ludmila Noskoski, Marcelo Mignoni, Rogério Marcos  
Dallago.

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

*\*E-mail: alinematuella@gmail.com*

**RESUMO** – Os processos que utilizam lipase são atraentes em função das suas diferentes aplicações. Porém, suas aplicações são limitadas pela baixa estabilidade em longo prazo e a dificuldade em recuperá-las após seu uso. A técnica para imobilizar enzima é conhecida como eficiente maneira de resolver estes problemas. A imobilização de enzimas em matrizes obtidas pelo processo sol-gel é vantajosa, pois, preserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi determinar a concentração das variáveis enzima, aditivo e água na imobilização da lipase comercial CALB para a obtenção da máxima atividade de esterificação (AE). A enzima foi imobilizada em xerogel obtido pela técnica sol-gel, com o uso de TMOS como precursor da sílica. A otimização do processo de imobilização foi realizada por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> completo. O planejamento consistiu de 17 experimentos, na qual a concentração de enzima variou de 0,058-0,662 g, aditivo 0,066-0,234 g e água 9,96-20,04. O modelo de regressão apresentou uma correlação de 0,9668 com os dados experimentais. O  $F_{\text{calculado}}$  (22,67) apresentou-se maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$  (3,68), o que validou o modelo proposto. A otimização do processo deu-se nos níveis codificados 0,084, 0,227 e 0,07 para água, enzima e aditivo respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores 15,25 (mL) de água, 0,4 (g/mL) de enzima e 0,15 (g/mL) de aditivo. Uma nova imobilização foi realizada nas condições otimizadas e obteve-se uma AE de 427 U/g e um rendimento de 483 %.

**Palavras-chave:** Atividade de esterificação, rendimento de imobilização, planejamento de experimentos.

## 1 INTRODUÇÃO

As aplicações industriais de lipases são frequentemente limitadas pela falta de estabilidade operacional, de armazenamento em longo prazo e a dificuldade existente em recuperá-las após seu uso. A técnica de imobilização é conhecida como uma eficiente maneira de resolver estes problemas e pode fornecer à enzima

muitas vantagens como o aumento da atividade enzimática, maior estabilidade e possibilidade de reutilização (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Dentre as técnicas de imobilização utilizadas, destaca-se a imobilização de enzimas em matrizes sol-gel, que consiste em reter a molécula alvo no interior da matriz ou em sua superfície, o que confere estabilidade mecânica e bioquímica superior as técnicas convencionais (SOUZA, 2013).

O tetraetilortossilicato (TEOS) e o tetrametilortossilicato (TMOS) são os precursores mais utilizados para sintetizar silicatos. Suas hidrólises em soluções aquosas, associados às reações de policondensação adicionais, podem causar uma formação de partículas de sol, conduzindo à auto-organização em uma rede tridimensional porosa (CHAUDHURY et al., 2007).

Jin e Brennan (2002) demonstraram que, a fim de melhorar ainda mais a atividade de enzimas imobilizadas em sol-gel, aditivos podem ser introduzidos em sol-gel baseado em sílica com o objetivo de proteger as enzimas de desnaturação feito através da formação de um escudo entre a proteína e ambiente reativo.

O uso de polietilenoglicol (PEG) como aditivo na imobilização enzimática concede melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato entre a interface água/óleo, e favorece uma condição necessária para a expressão da atividade hidrolítica da lipase imobilizada (SOARES et al., 2001). Vale salientar que os aditivos não ativam a enzima, em vez disto, apresentam um efeito estabilizante que previne a desnaturação devido sua interação com o suporte (VILLENEUVE et al., 2000).

Cabe salientar que a quantidade de lipase imobilizada no suporte depende de vários parâmetros tais como o tipo de lipase, a superfície de suporte, as condições ambientais e protocolo de imobilização. Além disso, o uso de altas concentrações de enzima na imobilização não aumenta a atividade do suporte imobilizado, ao contrário, pode ocorrer uma redução da atividade da enzima imobilizada devido às interações enzima-enzima, na qual o centro ativo da lipase pode ser inativado (YÜCEL, 2012).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) em xerogel, utilizando TMOS como precursor e otimizar o processo de imobilização utilizando três variáveis: massa total de água, concentração de enzima e aditivo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Processo de imobilização

A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario et al. (2009). Os suportes foram preparados solubilizando CTMABr em água (diferentes concentrações), solução enzimática e solução do aditivo, conforme Tabela 1. Essa solução foi submetida por 1 h sob agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm. Após este período, foi adicionado TMOS e etanolamina. Posteriormente, a solução foi novamente submetida a agitação, em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm, por um período de 24 h para completar a secagem do biocatalisador imobilizado.

### 2.2 Delineamento experimental

Para a otimização do processo de imobilização, a fim de se obter a máxima atividade de esterificação, um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> completo foi construído, com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e três pontos centrais. Os níveis das variáveis foram de 0,05 a 0,66 (g/mL) para a concentração da

enzima, de 0,06 a 0,23 (g/mL), para a concentração de aditivo e 9,96-20 mL para o volume de água (o volume total de água foi formado pela água adicionada, pela solução enzimática (2 mL) e a solução do aditivo PEG 1500 (1 mL)), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento composto central rotacional para variáveis água, enzima e aditivo na imobilização da lipase CAL B em sílica a partir de TMOS

Variável	Código	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Água (mL)	X <sub>1</sub>	9,960	12,000	15,000	18,000	20,040
Enzima (g/mL)	X <sub>2</sub>	0,058	0,180	0,360	0,540	0,662
Aditivo (g/mL)	X <sub>3</sub>	0,066	0,100	0,150	0,200	0,234

### 2.3.1 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos do DCCR foram analisados por análise de variância e metodologia de superfície de resposta. Um modelo matemático de segunda ordem foi obtido, que inclui todos os termos significativos obtidos a fim de calcular a resposta prevista.

### 2.4 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação (AE) foi determinada na solução enzimática (enzima livre) e nos xerogéis formados. A atividade foi quantificada através da reação de síntese de oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar de 1:1 (mistura padrão), conforme descrito na literatura (FERRAZ et al., 2012) A reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada ou livre (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 min. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para inativar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi quantificada por titulação com NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> até o meio atingir pH 11. Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Otimização dos parâmetros experimentais de imobilização

A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade de esterificação obtidos para as condições de massa total de água e concentração de enzima e PEG testadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Tabela 2. Planejamento DCCR 2<sup>3</sup> completo para otimizar variáveis para imobilização da lipase em sílica utilizando TMOS como precursor para a máxima atividade de esterificação (AE)

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Água (mL)	Enzima (g)	Aditivo (g)	AE±σ
1	-1	-1	-1	12	0,18	0,1	133,37 ± 33,97
2	+1	-1	-1	18	0,18	0,1	176,45 ± 28,43
3	-1	+1	-1	12	0,54	0,1	184,30 ± 42,56
4	+1	+1	-1	18	0,54	0,1	230,35 ± 21,00

5	-1	-1	+1	12	0,18	0,2	173,34 ± 12,38
6	+1	-1	+1	18	0,18	0,2	182,22 ± 36,70
7	-1	+1	+1	12	0,54	0,2	210,58 ± 42,12
8	+1	+1	+1	18	0,54	0,2	262,22 ± 14,65
9	-1,68	0	0	9,96	0,36	0,15	139,13 ± 11,59
10	+1,68	0	0	20,04	0,36	0,15	152,94 ± 11,76
11	0	-1,68	0	15	0,0576	0,15	199,03 ± 33,47
12	0	+1,68	0	15	0,6624	0,15	255,31 ± 29,01
13	0	0	-1,68	15	0,36	0,066	145,18 ± 17,51
14	0	0	+1,68	15	0,36	0,234	174,74 ± 6,58
15	0	0	0	15	0,36	0,15	393,26 ± 19,46
16	0	0	0	15	0,36	0,15	394,92 ± 17,92
17	0	0	0	15	0,36	0,15	394,20 ± 11,59

Pode-se observar na Tabela 2 que a maior atividade de esterificação foi observada no ponto central (experimentos 15, 16 e 17), no qual as concentrações das variáveis água, enzima e aditivo na imobilização da lipase foram 15 mL, 0,36 g/mL e 0,15 g/mL, respectivamente.

Os resultados obtidos nos experimentos foram tratados estatisticamente, e o modelo foi validado pela análise de variância, na qual se obteve um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9668 e o  $F_{\text{calculado}}$  (22,67) maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$  (3,68). O que permitiu, desta forma, a construção da superfície de resposta e a curva de contorno apresentadas na Figura 1.

A partir dos resultados do coeficiente de regressão, obteve-se o modelo matemático (Equação 1), na qual todas variáveis lineares e quadráticas bem como a interação entre elas foram significativas e apresentaram  $p < 0,05$ . Os efeitos lineares das variáveis água, enzima e aditivo foram positivo sobre a atividade de esterificação (12,67, 23,20, 11,25, respectivamente). Por outro lado, os efeitos quadráticos das variáveis água, enzima e aditivo foram negativos sobre a atividade de esterificação (-81,21, -52,46-76,27). A interação entre a água e a enzima, e enzima e aditivo apresentaram efeito positivo (5,72 e 1,55), porém a interação entre água e aditivo apresentou efeito negativo (-3,58) na atividade de esterificação da lipase imobilizada.

$$AE = 392,13 + 12,67x_1 - 81,21x_1^2 + 23,20x_2 - 52,46x_2^2 + 11,25x_3 - 76,27x_3^2 + 5,72x_1x_2 - 3,58x_1x_3 + 1,55x_2x_3 \quad \text{Equação 1}$$

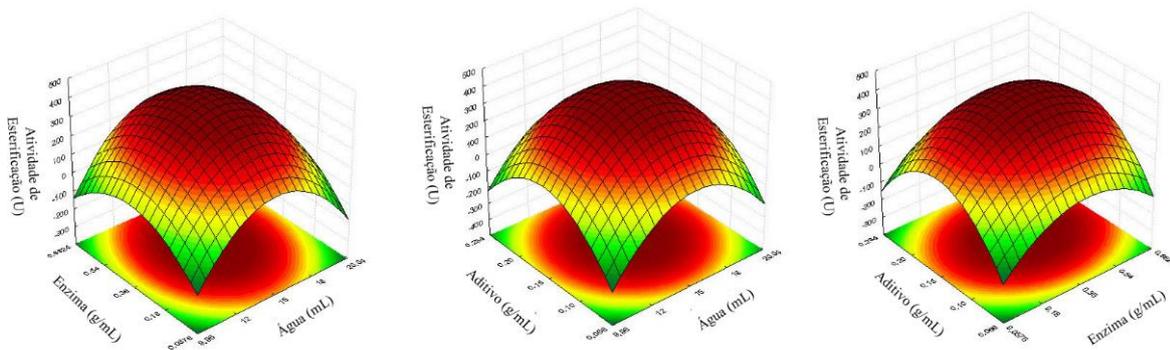
O uso da metodologia de superfície de resposta tem a vantagem de permitir a estimativa dos efeitos das variáveis experimentais sobre a variável resposta dentro dos limites estudados no planejamento experimental.

Desta forma, os valores ótimos das variáveis experimentais podem ser calculados a partir da modelagem matemática dos dados, quando a superfície de resposta é validada por análise de variância.

A concentração ótima de água ( $X_1$ ), enzima ( $X_2$ ) e aditivos ( $X_3$ ) para máxima atividade de esterificação foi calculada por meio da solução de um sistema linear de ordem  $3 \times 3$ . Este sistema foi obtido pelas derivadas parciais do modelo em relação as três variáveis e igualadas a zero. As atividades de esterificação máximas da lipase imobilizada foram obtidas nos níveis codificados 0,084, 0,227 e 0,07 para água, enzima e aditivo

respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores 15,25 (mL) de água, 0,4 (g/mL) de enzima e 0,15 (g/mL) de aditivo.

Figura 1. Superfície de resposta da influência da concentração de água, enzima e aditivo na atividade de esterificação da lipase imobilizada em sílica utilizando TMOS como precursor a partir do DCCR



Observa-se nas superfícies de resposta da Figura 1 que as máximas atividades para o DCCR encontram próximas ao ponto central, esses valores foram definidos a partir do modelo matemático anteriormente. A partir destes resultados, realizou-se uma nova imobilização nas condições ótimas indicadas pelo modelo, a fim de validar experimentalmente o modelo proposto.

### 3.2 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo

A Tabela 3 apresenta o resultado dos experimentos nas condições ótimas descritas pelo modelo estatístico para confirmação das variáveis massa de enzima, água e aditivo ótimas para obtenção de máxima atividade de esterificação.

Tabela 3. Resultado do teste das condições ótimas previstas pelo modelo

Atividade experimental $\pm \sigma$ (U/g)	Atividade predita (U/g)	Erro relativo (%)	Rendimento (%)
426,91 $\pm$ 11,86	395,71	7,31	483,69

Observa-se que as atividades experimentais obtidas na imobilização nas condições descritas pelo modelo apresentaram valor similar ao predito pelo modelo, apresentando um erro relativo de 7,31%. O rendimento da imobilização também foi calculado e apresentou o valor de 483%. O resultado obtido evidencia que o método de imobilização e o uso de aditivo durante o processo apresenta vários efeitos no processo de imobilização e um deles é manter a atividade catalítica da enzima e o aumento do rendimento.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho de imobilização da lipase CALB em sol-gel formado com o precursor silano tetrametilortossilicato, demonstraram que este, em conjunto com o aditivo PEG, são eficientes na imobilização quanto a preservação da atividade catalítica da enzima. Foi possível, pelo DCCR obter valores de massa de água e concentração de enzima e PEG ótimos para a obtenção da máxima atividade de esterificação da enzima imobilizada. A imobilização posterior comprovou a eficiência do método DCCR utilizado para determinar os

valores das variáveis estudadas. Além disso, com os parâmetros definidos, torna-se possível a realização de outros estudos para avaliação da eficiência deste suporte, como por exemplo, estabilidade de estocagem, térmica e operacional.

## 5 REFERÊNCIAS

- CHAUDHURY, N. K.; GUPTA, R.; GULIA, S. Sol-gel technology for sensor applications. **Defence Science Journal**, v. 57, p. 241-253, 2007.
- 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.
- JIN, W.; BRENNAN, J. D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 461, p. 1-36, 2002.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, p. 334-340, 2009.
- SOARES, C. M. F. CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 703-718, 2001.
- VILLENEUVE, P. MUDERHWA, J.M. GRAILLE, J. HAAS. M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- YÜCEL, Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. **Fuel Processing Technology**, v. 99, p. 97-102, 2012.
- SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2013.
- GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, 2885-2904, 2011.