

Área: Engenharia de Alimentos

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE PELA TÉCNICA SOL-GEL
UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LÍQUIDO IÔNICO COMO
ADITIVO**

**Katarine Levandoski, Aline Ficanha, Angela Antunes, Mateus Bopsin, Rogério Dallago
Marcelo Mignoni***

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

**E-mail: katarinelevandoski@gmail.com*

RESUMO – Os processos que utilizam lipases são atraentes em função das suas diferentes aplicações. Porém, estas são limitadas pela baixa estabilidade operacional e a longo prazo. A técnica de imobilização enzimática é conhecida como uma maneira eficiente de contornar tais problemas. A imobilização de enzimas em matrizes obtidas pela técnica de sol-gel utilizando aditivos é promissora, pois, preserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação. O uso de líquidos iônicos como aditivo neste processo, é recente, mas vários trabalhos da literatura, demonstram a sua eficiência até mesmo superior aos aditivos convencionais. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo imobilizar em suporte inorgânico a lipase CALB em xerogel obtido pela técnica sol-gel empregando como aditivo o líquido iônico brometo de 1-octil-3-metilimidazólio. O tetraetilortosilicato foi empregado como precursor da sílica. Avaliou-se a influência da concentração de aditivo líquido iônico na imobilização. A eficiência do processo foi avaliada considerando a atividade de esterificação dos derivados obtido. Os melhores resultados foram encontrados quando foi utilizado a concentração de 1% de líquido iônico com atividade de esterificação e rendimento de aproximadamente 500 (U/g) e 600%, respectivamente.

Palavras-chave: Xerogel, lipase, líquido iônico, imobilização.

1 INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas que atuam sobre lipídeos e sua principal função é catalisar reações de esterificação, interesterificação e hidrólise. São importantes catalisadores que podem ser utilizados em diferentes aplicações devido sua enantio e regioseletividade, na qual possibilita eficientes reações com baixa formação de

subprodutos, tornando-se uma alternativa ambiental e economicamente viável comparados aos catalisadores químicos convencionais (BARBOSA, 2014).

Os processos industriais utilizam enzimas para diversas aplicações, porém algumas vezes se tornam inviáveis, devido alguns fatores como, por exemplo: baixa atividade catalítica, baixa estabilidade operacional, dificuldade na separação da mistura dos reagentes, contaminação, entre outros. Além disso, o custo também é um fator limitante para aplicação de enzimas em processos de larga escala (ZARCULA et al., 2009). Uma das maneiras de reverter esta situação, é utilizando a imobilização enzimática, além do uso de aditivos no processo de imobilização que tem sido foco de estudo com o objetivo de se obter a estabilidade operacional do biocatalisador, separação dos produtos do meio reacional com maior facilidade, além de melhorar a eficiência catalítica da enzima (WANG & HSIEH, 2008; SABBANI et al., 2006).

A imobilização de enzimas é uma técnica cuja finalidade é estabilizar as biomoléculas fixando-as por meios químicos (estabelecido de, no mínimo, uma ligação covalente entre um grupo funcional do suporte e os resíduos terminais de uma enzima, ou entre duas ou mais moléculas de enzima) e físicos (que não envolve nenhum tipo de ligação química, somente forças físicas) em suportes insolúveis inertes ao meio reacional (ZANIN e MORAES, 1998; VITOLO, 2001; BARBOSA, 2013).

O uso de aditivos no processo de imobilização sol-gel é relatado na literatura como agentes que influenciam positivamente o aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas (HARA et al., 2010). Essa influência está diretamente associada à proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima. Dentre os principais aditivos utilizados na imobilização de enzimas, destacam-se a albumina, álcool polivinílico, polietilenoglicol e, recentemente, o uso de líquidos iônicos (SOUZA et al., 2013; ZARCULA et al., 2010; HARA et al., 2010; URSOIU et al 2012; BARBOSA et al., 2014).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A enzima utilizada na imobilização foi a lipase *Candida antarctica* B (Lipozyme) adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda. Para a imobilização foram utilizados álcool etílico PA (Merck), tetraetilortosilicato (Aldrich), ácido bromídrico hidróxido de amônio (Quimex), líquido iônico brometo de 1-octil-3-metilimidazólio que foi sintetizado com 1-metilimidazol (Aldrich), 1-bromo-octano (Aldrich), acetonitrila (Sigma-Aldrich).

2.2 Métodos

A lipase foi imobilizada de *Candida antarctica* B (CALB) foi imobilizada de acordo com o método descrito por Ficanha et al. (2015). Em um béquer adicionou-se 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) dissolvidos em 5 mL de álcool etílico absoluto e 1,61 mL água destilada em uma proporção molar de (1:4:4) e 3 gotas de ácido bromídrico. A mistura ficou sob agitação por 90 min, 40 °C, 180 rpm. A esta solução obtida, adicionou-se

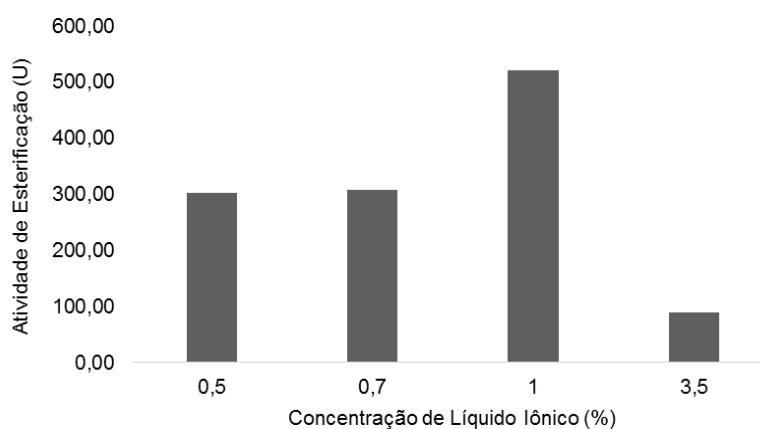
a solução enzimática, e o aditivo líquido iônico. A mistura foi mantida em condições estáticas por 24 h para a completa condensação química. Posteriormente, o suporte foi condicionado em dessecador a vácuo por 48 h para completa secagem. Após este procedimento foram feitos os testes posteriores.

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela capacidade de síntese do oleato de etila realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Esta reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada (0,1 g de suporte) ao meio reacional e a reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm, 40 min. A quantidade de ácido consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M (FERRAZ, et al., 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

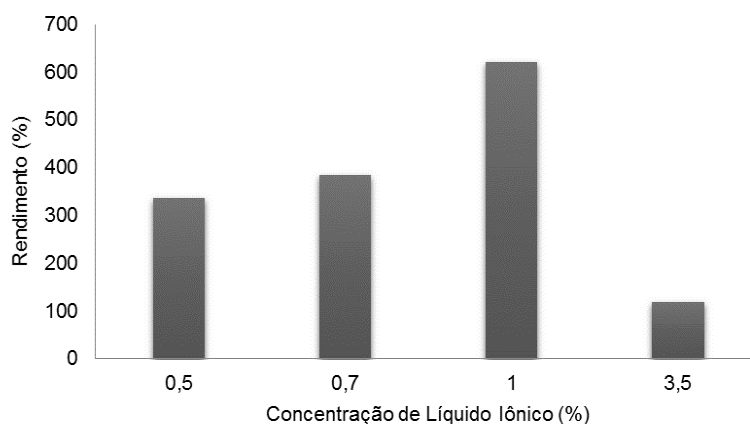
As Figuras 1 e 2 apresentam a atividade de esterificação e o rendimento, respectivamente, obtidos pela imobilização em xerogel da lipase *Candida antarctica* B (CAL B) com o uso de diferentes concentrações de líquido iônico como aditivo.

Figura 1 Atividade de esterificação em diferentes concentrações de líquido iônico



Pode-se observar na Figura 1 que os maiores valores de atividade de esterificação encontrados foram nas amostras com 0,5, 0,7 e 1% de concentração de LI com atividades de 302, 308 e 520 U, respectivamente, indicando que bons resultados podem ser encontrados utilizando menores concentrações de líquido iônico como aditivo, e a melhor atividade de esterificação encontrada foi na concentração de 1% de líquido iônico.

Figura 2 Rendimento de imobilização em diferentes concentrações de líquido iônico



De acordo com a Figura 2, o mesmo comportamento pode ser observado em relação a concentração do líquido iônico para o rendimento de imobilização. Os maiores rendimentos de 330, 380 e 620 % foram obtidos nos ensaios com menores valores de concentrações de líquido iônico, 0,5, 0,7, e 1% respectivamente. Neste teste preliminar foi possível determinar a melhor concentração para o rendimento e para a atividade de esterificação que foi de 1% em relação ao líquido iônico. Em todos os ensaios os rendimentos foram maiores que 100%, provando que o aditivo atua no processo de imobilização, evitando a desnaturação da enzima.

A presença do líquido iônico como aditivo na imobilização pode atuar da mesma maneira que os outros aditivos descritos na literatura, tais como polivinilálcool (PVA) e o polietilenoglicol (PEG). Durante o processo de imobilização ou síntese do suporte, possivelmente, o aditivo pode estar modificando a hidrofobicidade do microambiente, exercendo influência no nível de umidade dentro do suporte (MOHIDEM et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

O estudo se mostrou eficaz para a imobilização da enzima *Candida antarctica* B em xorogel obtido pela técnica sol-gel na presença do líquido iônico brometo de 1-octilmetilimidazólio como aditivo, na qual as melhores atividades foram de 302, 308 e 520 U para as concentrações de líquido iônico 0,5, 0,7 e 1% respectivamente e um comportamento semelhante foi observado em relação ao rendimento também quando utilizou-se 0,5, 0,7 e 1% de líquido iônico com valores de 330, 380 e 620 % respectivamente. A maior atividade encontrada foi na concentração de 1 % de aditivo, nos testes preliminares.

5 AGRADECIMENTOS

FAPERGS;
CNPq;
URI - Campus Erechim;
SC&T/RS

6 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, A. DOS S.; SILVA, M. A. DE O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel. **Química Nova**, v. 37, p. 969-976, 2014.
- 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.
- FICANHA, A. M. M.; NYARI, N. L.D.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M.; Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v.38, p. 364-369, 2015.
- HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. Supported ionic liquids in Burkholderia cepacia lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 129-134, 2010.
- MOHIDEM N. A.; MAT H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. **The Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 61, p. 96-103, 2011.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 141-150, 2013.
- URSOIU, A.; PAUL, C.; KURTÁN, T.; PÉTER, F. Sol-gel entrapped *Candida antarctica* lipase B- A Biocatalyst with excellent stability for kinetic resolution of secondary alcohols. **Molecules**, v. 17, p. 13045-13061, 2012.
- VITOLLO, M.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.. Imobilização de Enzimas. **In: Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- WANG, Y.; HSIEH, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal. Membrane Science**, v. 309: p. 73 - 81, 2008.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of cassava starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72: p. 383-394, 1998.
- ZARCULA, C.; CORÍCI, L.; CROITORU, R.; URIOIU, A.; PETER, F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 79-86, 2010.