

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE DE *Candida rugosa* EM CELULIGNINA DE *Eucalyptus grandis*

Fabrcio Maciel Gomes*, Rosa Ana Conte, Heizir Ferreira de Castro

Laboratório de Biocatálise – Departamento de Engenharia Química
Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL
Caixa Postal – 116, CEP: 12.600-970 – Lorena/SP
E-mail*: fabricio@dequi.fauenquil.br

Palavras-chave: Lipase, celulignina, imobilização.

Área do Conhecimento: III – Engenharias

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores de natureza protéica, que apresentam um alto grau de especificidade em relação ao substrato e atividade catalítica bem superior a de qualquer catalisador não enzimático. Esta alta eficiência limita a produção de compostos secundários, muitas vezes poluentes e reduz gastos com a matéria-prima e energia culminando em maior rendimento do processo. Entre os processos químicos de maior interesse industrial está às reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente [1].

Lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3, são obtidas de fontes microbianas, animais e vegetais, e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reação reversível, portanto o equilíbrio pode ser alterado pela variação de concentração de reagentes ou produtos. Essas duas reações básicas podem ser combinadas de modo seqüencial, fornecendo um grupo de reações denominado interesterificação [2].

O potencial de uso industrial das lipases é destacado pela versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese [3]. Além disso, as lipases possuem especificidade comprovada, fornecendo produtos que não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais. Esta habilidade catalítica tem sido aplicada na modificação de óleos e

gorduras, síntese de compostos orgânicos, suplementos de detergentes e procedimentos analíticos [4].

No entanto, o uso industrial de enzimas como catalisadores depende da eficiência de sua imobilização e do emprego de suportes adequados, de tal forma que o investimento inicial em matéria-prima (enzima e suporte) seja compensado pela elevada atividade e estabilidade do derivado imobilizado obtido [5].

O conceito de imobilizar proteínas e enzimas, em suportes insolúveis ao meio reacional tem sido objeto de pesquisas há mais de 40 anos e, conseqüentemente diferentes métodos e suportes foram avaliados, assim como muitas aplicações potenciais foram sugeridas [6]. O principal objetivo desta técnica é reutilizar a enzima, especialmente se são difíceis de serem obtidas e apresentam custo elevado. Além disso, seu emprego conduz a obtenção de produtos com melhor qualidade, reduzindo os custos de purificação [6].

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos e inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, tem sido estudada para a imobilização de enzimas [7, 8]. No entanto, resultados mais eficientes são obtidos pela utilização de suportes industrializados e de reagentes para a ativação dos suportes de alto custo. Em função disso, o estudo sistemático de imobilização em matrizes alternativas de baixo custo (casca de coco, carbonato de cálcio, resíduos lignocelulósicos, óxidos metálicos) estão

sendo pesquisados como alternativa às matrizes disponíveis comercialmente [9].

Celulignina é o produto obtido na pré-hidrólise de biomassa em reatores revestidos com materiais refratários (Nb), com médio poder calorífico (4500 kcal/kg) e combustível catalítico que se destina à utilização em termoelétricas de ciclo combinado, gerando energia com custos inferiores aos da termoelétrica (<US\$ 30,00/MWh) [10].

Devido ao seu alto grau de polimerização (35% lignina + 65% celulose) e propriedades físico-químicas adequadas, este material pode apresentar grande potencial para ser utilizado como matriz de imobilização de catalisadores bioquímicos.

Neste trabalho, celulignina foi usada como suporte para imobilização de lipase de origem microbiana. Foram realizados experimentos com o objetivo de selecionar o procedimento mais eficiente para obtenção de amostras ativas e estáveis de lipase imobilizada nesse suporte.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os experimentos foram realizados com lipase de origem microbiana (*Candida rugosa*), adquirida da Sigma Chemicals Co (Tipo VII), com atividade de 1400 U/mg de sólido. Como suporte foi empregado celulignina de madeira (*Eucalyptus grandis*), gentilmente cedida pelo Departamento de Materiais da FAENQUIL (Lorena/SP), na forma de um pó marrom escuro, com massa específica igual a 0,35 g/cm³ e 3,5% de umidade em peso. O suporte foi classificado de acordo com sua granulometria por meio de um conjunto de peneiras, obtendo-se uma maior proporção do material com diâmetro de partícula entre 74 a 177 microns. Solução emulsificada de azeite de oliva (baixa acidez) com goma arábica (Synth) na relação 1:1 e solução equimolar de n-butanol (98%, Merck) e ácido butírico (95%, Vetec) em heptano (Synth) previamente desidratado com peneira molecular em forma de pellets 0,32 cm de diâmetro (silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X (BHD Chemicals), foram usados como substratos nas reações de hidrólise e síntese, respectivamente. Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

Pré-tratamento do suporte

Devido à característica ácida da celulignina, fator limitante de utilização como matriz para imobilização de lipases [8], inicialmente o suporte foi neutralizado pela adição de uma solução 0,1 M de NaOH, numa proporção 1:15 (sólido: líquido), sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o suporte foi filtrado em funil de Büchner e extensivamente lavado com água destilada até pH 7,0 (neutro). O suporte neutralizado foi submetido a um processo de secagem em estufa a 60°C por um período de máximo de 24 horas em 1 atm.

Ativação do Suporte com Glutaraldeído

O procedimento foi baseado na metodologia descrita por CASTRO *et al.* [11]. Inicialmente, o suporte foi submetido a vácuo por 10 minutos. Sob vácuo o glutaraldeído, numa concentração de 2,5% v/v em tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0), foi lentamente adicionado atingindo completa imersão do sólido. Em seguida, o vácuo foi retirado e o material foi transferido para um béquer, e adicionados 4,6 mL da solução de glutaraldeído (2,5% v/v). A reação foi conduzida sob agitação constante em temperatura ambiente durante 1 hora. O suporte ativado foi transferido para um funil de Büchner e lavado com água destilada eliminando o excesso de glutaraldeído. Após a lavagem, a água foi extraída do sistema durante 30 minutos.

Ativação do Suporte com Metaperiodato de Sódio

Foi adotada a metodologia descrita por CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* [12]. O suporte foi suspenso com uma solução 0,5 M de Metaperiodato de sódio (NaIO₄), sob agitação constante, durante 90 minutos em ambiente isento de claridade. Em seguida, o suporte ativado foi transferido para um funil de Büchner e lavado com água destilada até pH 7,0 (neutro). Após a lavagem, a água foi succionada do sistema durante 30 minutos.

Imobilização da Lipase

Celulignina *in natura* e ativada, foi umedecida em n-Hexano, sob condições de agitação constante (100 rpm) durante 3 horas. Após esse período, o excesso de n-

Hexano foi removido e em seguida adicionado lipase dissolvida em água, adotando uma relação mássica entre enzima e suporte (1:4), como anteriormente determinada [13]. A fixação da lipase ao suporte foi efetuada sob agitação durante 3 horas à temperatura ambiente, seguida por período adicional de 18 horas em condições estáticas a 4°C. A separação do derivado imobilizado foi efetuada por filtração a vácuo (papel de filtro, Whatman Nº 41), com duas lavagens do complexo suporte-enzima com n-Hexano. O rendimento de imobilização foi calculado pela equação 1:

$$RI (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

onde: U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização; U_s = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca).

Determinação do Teor de Proteína

O conteúdo de proteína da lipase solúvel foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford [14] utilizando-se o reagente de brilhante de Comassie blue e albumina bovina cristalina (BSA) como padrão.

Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática das lipases nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise, adotando como substrato solução emulsificada de azeite de oliva, conforme metodologia modificada por SOARES *et al.* [15]. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenoltaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio (pH 7,0 e temperatura de 37°C). As atividades foram expressas em µmol/mg.min (U), onde miligrama refere-se à massa seca de lipase imobilizada.

Determinação da Atividade de Esterificação

A atividade de esterificação da enzima imobilizada em celullignina foi determinada pela formação do Butirato de

butila ($C_8H_{16}O_2$) na reação de n-Butanol (250 mM) com ácido butírico (250 mM) em n-Heptano a 37°C com 0,5 gramas de enzima (massa seca). Todos os experimentos foram realizados sob agitação constante de 150 rpm, por um período de 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio reacional no tempo inicial e após intervalos pré-determinados de seis horas. Os teores de Butirato de butila formado e de n-butanol consumido foi quantificada por cromatografia em fase gasosa (Cromatógrafo Varian 3800), empregando uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh), a 60°C. Hexanol foi usado como padrão interno. O gás de arraste foi o nitrogênio, mantido num fluxo 30 mL/min no interior da coluna, valor ideal para eficiência da mesma. Uma unidade de atividade (esterificação) foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 µmol de Butirato de butila por minuto nas condições do ensaio.

Análise Elementar

As amostras de lipase livre, celullignina *in natura*, ativada e seus derivados imobilizados, foram submetidas à análise de carbono, hidrogênio e nitrogênio para a determinação da fixação da enzima ao suporte por meio do balanço de massa dos elementos comuns, C, H e N, utilizando Analisador Elementar (Perkin Elmer CHN-2400).

Análise Térmica

As amostras de celullignina *in natura*, ativada e derivados imobilizados, foram submetidas à análise térmica (Termobalança TGA-50, Shimadzu) para a determinação da porcentagem de material grafitado, tomando como base a perda da massa em função da temperatura (16). As seguintes condições operacionais foram empregadas: razão de aquecimento e de arrefecimento de 20°C/min na faixa de temperatura ambiente a 900°C, com variação de massa de 4 a 8 mg, e análise de ancoragem de 200 a 300°C. Os cálculos foram realizados por meio da equação 2:

$$\% \text{ de material grafitado} = \frac{\omega_i - \omega_f}{\omega_f} \times 100 \quad (2)$$

onde: ω_i = massa inicial da amostra; ω_f = massa final da amostra.

Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de lipase livre, celulignina *in natura*, ativada e derivados imobilizados, foram submetidas a análise no equipamento de Análise FTIR (Spectrum One – Perkin Elmer), com aquisição de dados pelo software Spectrum versão 3.02. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando a técnica de análise de superfície.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras do suporte neutralizado e ativado com glutaraldeído e Metaperiodato de sódio (NaIO_4) foram caracterizadas por técnicas analíticas recomendadas [16], tais como: análise elementar (Tabela 1), termogravimétrica (Tabela 2) e espectroscopia no infravermelho.

Analisando os dados contidos nas Tabelas 1 e 2, observa-se que a ativação da celulignina com glutaraldeído e metaperiodato de sódio produziu pequenas alterações na composição estrutural da celulignina em termos de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N), entretanto, não foi observado aumento da estabilidade térmica (Tabela 2).

Tabela 1. Análise elementar da celulignina *in natura* e ativada.

Suporte/ Elementos	C (%)	H (%)	N (%)
Celulignina <i>in natura</i>	49,20	6,86	0,44
Celulignina – GA	39,58	5,19	0,31
Celulignina – MP	45,16	5,36	0,11

Tabela 2. Análise termogravimétrica da celulignina *in natura* e ativada.

Suporte	Massa Inicial (mg)	Massa Final (mg)	Material Grafitado (%)
Celulignina <i>in natura</i>	4,75	4,05	14,73
Celulignina – GA	3,20	2,84	11,25
Celulignina - MP	5,22	4,47	14,36

Com os dados obtidos da análise Espectroscopia no Infravermelho por método Transformada de Fourier, foi observado o aparecimento de uma banda na região de 1650 cm^{-1} , no suporte ativado com glutaraldeído, característico de grupos dialquil aldeídos (Tabela 3), comprovando, portanto, a incorporação de glutaraldeído no suporte.

Tabela 3. Frequência característica de grupos funcionais no Infra-Vermelho

Grupo Funcional	Frequência Característica (cm^{-1})
Aldeído Dialquil	1.600 – 1.700
Aminas Alifáticas	1.100 – 1.200

Fonte: Silverstein *et al.* [17]

Nota-se também no espectro da amostra do suporte ativado com Metaperiodato de sódio o aparecimento de bandas na região entre 1.600 e 1.700 cm^{-1} e o desaparecimento de bandas na região entre 1.000 e 1.100 cm^{-1} , no suporte tratado, confirmando a oxidação dos grupos hidroxilas contidos no suporte gerando grupos aldeídos (Tabela 3), tornando assim, os suportes tratados teoricamente mais eficazes para fixação de enzimas.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nos testes de imobilização da lipase em celulignina, adotando o procedimento de adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) empregando glutaraldeído (GA) e metaperiodato (MP) como agentes de ativação.

Apesar da similaridade das porcentagens de recuperação de proteína (>92%), foi constatado um aumento da ordem de 15% na atividade catalítica das amostras obtidas por ligação covalente, sugerindo que a celulignina quimicamente modificada tanto pela ação do glutaraldeído como metaperiodato de sódio fornece condições mais adequadas para a ligação da enzima ao suporte.

Tabela 4. Comparação do método de imobilização e do agente de ativação.

Método de imobilização	Atividade hidrolítica	Recuperação (%)
O	A	

	(U/mg)	Proteína	Atividade
LC – GA	85,26	97,32	24,36
LC – MP	95,80	92,97	27,37
ADS	73,06	95,94	20,87

Proteína oferecida = 54,6 mg

Unidades de atividade oferecidas = 700 U

Entre os agentes de ativação testados, o metaperiodato de sódio apresentou um desempenho superior ao obtido pelo glutaraldeído, produzindo amostras de lipase imobilizada com atividade média de 95,8 U/mg, o que corresponde a 27,37% de recuperação da atividade oferecida ao procedimento de imobilização. Em comparação com o método de imobilização por adsorção física, houve um incremento de aproximadamente 7,0 pontos percentuais no rendimento de imobilização.

Para verificar o superior rendimento de imobilização das amostras obtidas por ligação covalente, ou ainda verificar uma eventual possibilidade de resistência à transferência de massa para o transporte de moléculas do azeite de oliva (emulsão), nas amostras de lipase imobilizadas, determinou-se a atividade de esterificação para todas as preparações na reação de síntese do butirato de butila, a partir do n-butanol com ácido butírico. As sínteses foram realizadas, conforme metodologia descrita anteriormente, sendo os resultados apresentados na Figura 1.

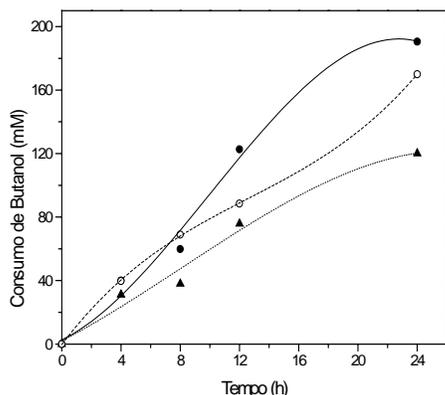


Figura 1. Consumo de n-butanol na síntese do butirato de butila catalisado pela lipase imobilizada em celulignina *in natura* (▲) e ativada com glutaraldeído (●) e metaperiodato de sódio (○).

A observação da Figura 1 mostra que a utilização da lipase imobilizada em celulignina *in natura* (ADS), a máxima conversão de n-butanol obtida foi de 120 mM após 24 horas de reação. Esse valor foi significativamente mais elevado (190 mM) quando se empregou lipase imobilizada em celulignina ativada com glutaraldeído (LC-GA).

Na Tabela 5 encontram-se os valores das atividades de esterificação, e os percentuais de consumo dos substratos. Observa-se que apenas no caso da lipase imobilizada em celulignina ativada com glutaraldeído foram obtidas conversões elevadas e similares para ambos componentes do meio reacional (~82,6%) em produto.

Tabela 5. Comparação do comportamento catalítico das amostras de lipase imobilizada em celulignina.

Método de Imobilização	Atividade de Esterificação (μmol/mg min)	Conversão molar (%)	
		Butanol	Ác. Butírico
ADS	156,57	51,9	85,5
LC – GA	230,20	82,3	82,6
LC – MP	125,10	73,4	54,1

O perfil dos demais derivados imobilizados indica um desequilíbrio do consumo dos materiais de partida, sugerindo uma migração do componente ácido e/ou alcoólico para o suporte.

As amostras de biocatalisadores imobilizados foram submetidas à análise elementar para verificar a incorporação de enzima nos suportes. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.

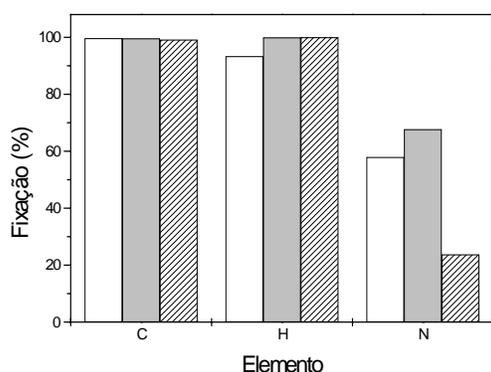


Figura 2. Balanço de massa por meio de análise elementar da lipase imobilizada em celulignina *in natura* () e ativada com glutaraldeído () e metaperiodato de sódio ().

A Figura 2 mostra que o derivado imobilizado obtido por ligação covalente em celulignina ativada com glutaraldeído (LC-GA) foi o que apresentou maior porcentagem de fixação de nitrogênio (67.73%). Esse valor pode ser correlacionado com a eficiência de incorporação da enzima ao suporte, tendo em vista que tanto a celulignina não ativada ou ativada apresenta valores extremamente baixos de nitrogênio (Tabela 1) e, portanto, todo percentual do nitrogênio contido no derivado imobilizado foi proveniente da enzima não solubilizada no suporte.

Informações obtidas por análise térmica, listadas na Tabela 6, são úteis na confirmação dos rendimentos de imobilização obtidos, relacionando com a estabilidade térmica dos sistemas imobilizados testados.

Tabela 6. Porcentagem de material grafitado para as amostras de lipase imobilizadas em celulignina.

Método de Imobilização	Massa Inicial (mg)	Massa Final (mg)	Material Grafitado (%)
ADS	3,71	3,38	9,76
LC-GA	4,73	4,18	13,15
LC-MP	5,22	4,42	18,10

Os resultados indicam que o sistema imobilizado obtido por adsorção física possui uma menor estabilidade térmica, indicando uma fraca adsorção entre lipase e o suporte.

Os dados obtidos pela análise de infravermelho dos derivados imobilizados permitiram a nítida observação da banda característica da lipase (1.122 cm^{-1}) apenas no derivado imobilizado ativado com glutaraldeído, sugerindo uma fixação adequada da enzima livre na superfície do suporte. Esse perfil foi confirmado pelo desempenho satisfatório dessa preparação de lipase imobilizada na síntese do butirato de butila.

No caso dos outros derivados imobilizados, foi observado que o pico característico da lipase foi parcialmente superposto no derivado imobilizado ativado com metaperiodato de sódio e totalmente superposto no derivado imobilizado no suporte *in natura*. Esses perfis de orientação das moléculas de lipase imobilizada (ADS e LC-MP) obtidas por espectroscopia de infravermelho, podem justificar os problemas de transferência de massa ocorridos para estas preparações na síntese do butirato de butila.

CONCLUSÕES

As informações obtidas via balanço de massa (CHN), porcentagem de material grafitado (TG), banda vibracional característica de ligação química identificável (FTIR), rendimento de imobilização (hidrólise do azeite de oliva) e atividade catalítica em meio orgânico (síntese do butirato de butila) foram úteis na determinação do biocatalisador imobilizado mais eficiente, o qual neste total de ensaios realizados foi a ligação covalente em celulignina ativada com glutaraldeído.

Considerando que a estabilidade operacional é um parâmetro de fundamental importância no desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, estão sendo realizados ensaios para determinar o tempo de meia-vida dessa preparação experimental de lipase imobilizada em meio aquoso (hidrólise de azeite de oliva) e orgânico (síntese de ésteres).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K. Faber, In: *Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, **1997**.
2. H. F. de Castro; W.A. Anderson, *Química Nova* **1995**, 18, 544.
3. N. N. Gandhi, *Journal of American Oil Chemist's Society*, **1997**, 74, 621.
4. R. M. Yahya, W. A. Anderson, M. Moo-Young, *Enzyme and Microbial Technology*, **1998**, 23, 438.
5. V. M. Balcão, A. L. Paiva, F. X. Malcata, *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 18, 392.
6. J. F. Kennedy; M. G. Roig, Principles of Immobilization of Enzymes, In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Edited A. Wiseman, T. J. Press, Great Britain, 3^o Edition, **1995**, 235.
7. R. F. Taylor, *Protein Immobilization: Fundamentals and Application*, Ed. Marcel Dekker, **1991**.
8. P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. M. Graile, M. J. Haas, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 9, 113.
9. M. G. Nascimento, P. R. Costa Neto, L.M. Mazzuco, *Biociência e Desenvolvimento*, **2001**, 17, 28.
10. D. G. Pinatti, A. G. Soares, C. A. Vieira, D. Rodrigues Jr., R. A. Conte in: *Anais do 6^o Brazilian Symposium of Chemistry Lignins and Wood Components*, Guaratinguetá, **2001**, Vol. 1, 26.
11. H.F. de Castro, R. Lima, I.C. Roberto, *Biotechnology Progress*, **2001**, 7, 1061.
12. M. G. Carneiro-da-Cunha, J. M. S. Rocha, M. H. Gil, *Biotechnology Techniques*, **1999**, 13, 103.
13. F. M. Gomes, R. L. M. Alcaide, R. A. Conte, H. F. de Castro in *Anais do VII Seminário de Hidrólise Enzimática e Biomassa*, **2002**, Vol. 1, 75.
14. M. M. A. Bradford, **1976**, *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
15. C. M. F. Soares, H. F. de Castro, F. F. de Moraes, G. M. Zanin, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1999**, 77/79, 745.
16. M. A. Ramos, M. H. Gil, E. Schacht, G. Matthis, W. Mondelaers, M.M. Figueiredo, *Powder Technology*, **1998**, 99, 79.
17. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1994**.