



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

Aguiar Mendes, Adriano; Moreira Barbosa, Bruno César; Faria Soares, Cleide Mara; Caetano Pinto da Silva, Maria Lucia; Ferreira de Castro, Heizir

Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol

Acta Scientiarum. Technology, vol. 28, núm. 2, julio-diciembre, 2006, pp. 133-140

Universidade Estadual de Maringá

Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226516010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol

Adriano Aguiar Mendes<sup>1</sup>, Bruno César Moreira Barbosa<sup>1</sup>, Cleide Mara Faria Soares<sup>2</sup>, Maria Lucia Caetano Pinto da Silva<sup>1</sup> e Heizir Ferreira de Castro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Cx. Postal 116, 12602-810, Lorena, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Tiradentes, Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: heizir@eel.usp.br

**RESUMO.** No presente trabalho, diferentes procedimentos de imobilização foram avaliados: adição direta da lipase em fosfato de zircônio (ZrP) e adição simultânea de lipase e agente estabilizante (polietilenoglicol, MM-1500) no mesmo suporte. A seleção desse aditivo foi baseada na sua compatibilidade com a lipase de *Candida rugosa*, conforme dados obtidos anteriormente empregando sílica de porosidade controlada como suporte. A metodologia de imobilização da lipase em ZrP na presença de PEG-1500 forneceu derivados imobilizados mais ativos (310,6 U mg<sup>-1</sup>) quando comparados com aqueles obtidos sem adição de PEG-1500 (162,8 U mg<sup>-1</sup>), proporcionando elevada recuperação da atividade oferecida na imobilização (88,7%). Nos testes catalíticos efetuados em meio orgânico (síntese de butirato de butila), foi também constatado um melhor desempenho dos derivados imobilizados obtidos na presença de PEG, em termos de atividade e estabilidade operacional. Esse resultado pode ser atribuído ao recobrimento da enzima pelo aditivo que provavelmente aumentou o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

**Palavras-chave:** lipase, imobilização, fosfato de zircônio, polietilenoglicol.

**ABSTRACT.** Activity and operational stability of the immobilized lipase on zirconium phosphate in the absence and presence of polyethylene glycol. In the present work, different immobilization procedures were evaluated: direct addition of the lipase on zirconium phosphate (ZrP), and simultaneous addition of lipase and stabilizing agent (polyethylene glycol, MM-1500) on the same support. The selection of this additive was based on its compatibility with the lipase from *Candida rugosa* according to data previously obtained using controlled pore silica as support. The methodology of lipase immobilization on ZrP in the presence of PEG-1500 supplied more active immobilized derivatives (310.6 U mg<sup>-1</sup>) when compared with those obtained without addition of PEG-1500 (162.8 U mg<sup>-1</sup>), providing high activity recovery in the immobilization step (88.7%). Better performance of the immobilized derivative prepared in the presence of PEG was also verified in organic medium (synthesis of butyl butyrate), in terms of activity and operational stability. These results can be attributed to the enzyme coated by the additive that probably increased the access of the substrate to the active site of the lipase.

**Key words:** lipase, immobilization, zirconium phosphate, polyethylene glycol.

## Introdução

As moléculas de água, que se encontram ao redor da molécula de enzima, exercem um papel importante na estabilidade e conformação estrutural devido, principalmente, a sua influência nas interações hidrofóbicas, além das forças de van der Waals, pontes salinas e pontes de hidrogênio (Yamane *et al.*, 1990; Faber, 1997).

Desta forma, pequenas variações no meio reacional, como: temperatura, pH, força iônica,

entre outras, podem induzir uma modificação na estrutura da enzima de sua forma ativa para sua forma desativada (Faber, 1997). Essa desnaturação é decorrente da exposição da parte hidrofóbica da enzima em água, o que promove um aumento do nível de hidratação da enzima. Assim, não é surpresa que a manipulação da natureza do meio e da quantidade de água ao redor da enzima tenha um profundo efeito sobre a estabilidade. A remoção da água da superfície da enzima conduz a uma

reorganização das moléculas de água devido ao incremento do número de ligações intramoleculares por pontes de hidrogênio que contribui para o aumento da rigidez da enzima (Yamane *et al.*, 1990; Faber, 1997). Esse efeito pode ser alterado pelo uso de aditivos hidrofílicos, como os polióis e polissacarídeos, que agem como reguladores da estrutura da enzima em meio aquoso (Yamane *et al.*, 1990; Gonçalves *et al.*, 1999).

Efeito estabilizante na atividade enzimática tem sido também observado em meios orgânicos, para aditivos como arabinol e sorbitol, os quais aumentaram a atividade da lipase em benzeno, solvente altamente apolar (Triantafyllou *et al.*, 1995). Nesse mesmo estudo, outros tipos de aditivos, como albumina e caseína, não apresentaram efeito de estabilização da lipase. Entretanto, o uso desses aditivos de origem proteica e não enzimática na etapa de imobilização de lipases tem aumentado significativamente a estabilidade dos derivados imobilizados (Wehtje *et al.*, 1993; Reetz *et al.*, 1996; Villeneuve *et al.*, 2000). Por outro lado, aditivos como polissacarídeos têm demonstrado efeitos não significativos na estabilização da enzima (Wehtje *et al.*, 1993).

Esses resultados e o fato de que o procedimento de imobilização pode causar desativação parcial da enzima sugerem que os aditivos durante a etapa de imobilização possuem outro tipo de mecanismo. Realmente aditivo não ativa a enzima, em vez disto, tem um efeito estabilizante, prevenindo a desativação da enzima quando ocorre a sua interação com o suporte (Reetz *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1998; Villeneuve *et al.*, 2000).

No caso específico das lipases, que exigem uma interface para sua total atividade catalítica, o uso de aditivos macromoleculares na etapa de imobilização tem mostrado efeitos estabilizantes significativos na atividade da lipase por meio do revestimento da interface, impedindo, desta forma, uma mudança na sua estrutura proteica (Wehtje *et al.*, 1993; Reetz *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1998; Villeneuve *et al.*, 2000). Segundo Bosley (1991), caseína, gelatina, albumina de ovo e albumina bovina são aditivos eficientes para imobilização de lipases em vários suportes. Resultados similares foram descritos por Reetz *et al.* (1996), que recomendam também o uso de outros tipos de aditivos macromoleculares, como, por exemplo, polietilenoglicol (PEG) e álcool polivinílico (PVA). O uso de aditivos de baixa massa molecular, tais como sorbitol, glicerol e triglicerídeos, não atuou na estabilização dos derivados imobilizados

(Bosley, 1991; Reetz *et al.*, 1996).

Em um estudo sistemático realizado por Soares *et al.* (2001; 2002; 2003), diferentes tipos de aditivos foram avaliados na atividade hidrolítica e sintética, bem como na estabilidade operacional de derivados imobilizados de lipase de *Candida rugosa* em sílica de porosidade controlada. Entre os aditivos testados, o polietilenoglicol (MM 1500) proporcionou um considerável aumento da atividade hidrolítica, reduzindo, desta forma, a desativação da enzima por interações lipase-suporte (Soares *et al.*, 2003).

Em trabalhos anteriores, lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em fosfato de zircônio por adsorção física e ligação covalente e os derivados imobilizados avaliados comparativamente em reações de hidrólise e esterificação (Porto *et al.*, 2002). Rendimentos de imobilização mais elevados foram obtidos para as amostras preparadas por adsorção física, confirmando dados da literatura em estudos conduzidos com enzimas imobilizadas covalentemente em matrizes tratadas por silanos que podem acarretar modificações conformacionais na enzima, alterando a estrutura tridimensional de seu sítio ativo (Porto *et al.*, 2002). O processo de imobilização covalente provavelmente ocasionou impedimentos estéricos que tornaram certas partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato azeite de oliva.

Considerando a potencialidade do fosfato de zircônio como matriz de imobilização de catalisadores bioquímicos, tanto em termos técnicos como econômicos em comparação à sílica de porosidade controlada (Porto *et al.*, 2002), e considerando a eficiência do polietilenoglicol como aditivo na etapa de imobilização de lipases em suportes sólidos, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições anteriormente estabelecidas para imobilização da lipase de *Candida rugosa* em fosfato de zircônio utilizando polietilenoglicol como agente estabilizante das interações entre enzima e suporte.

## Material e métodos

Lipase de origem microbiana de *Candida rugosa* (Tipo VII), com atividade específica de 1800 U mg<sup>-1</sup> de proteína (Bradford, 1976),  $\gamma$ -aminopropiltriethoxissilano ( $\gamma$ -APTS) e glutaraldeído (25% v/v) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), polietilenoglicol (PEG-MM 1500) da Synth (São Paulo, Brasil). Azeite de oliva (Carbonell-baixa acidez) foi comprado em mercado local. Substratos para as reações de esterificação (*n*-butanol, 98%, Merck e ácido butírico,

95%, Vetec, São Paulo, Brasil) foram desidratados com peneira molecular (silicato de alumínio e sódio, tipo 13 X-BHD Chemicals, Toronto, Canadá). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

#### Síntese do suporte inorgânico

Inicialmente foi obtido o cloreto de zirconila por fusão alcalina de um concentrado de zirconita, seguido de duas lixiviações (aquosa e outra ácida). O material obtido foi levado à secagem por evaporação direta em uma placa de aquecimento, sendo em seguida submetido a uma lixiviação com ácido clorídrico concentrado (sem agitação/48h). Após esse tratamento, foram efetuadas diversas lavagens em acetona. Em seguida, foi preparada uma solução com o cloreto de zirconila em 0,5 M de HCl e adicionado sob agitação constante  $\text{H}_3\text{PO}_4$  3,0 M, em uma proporção de 1:2 (Zr:PO<sub>4</sub>). O precipitado gelatinoso obtido foi deixado em repouso por 24 horas, sendo então filtrado e lavado com solução de ácido fosfórico a 2% e com água deionizada até ausência de íons cloreto. O produto obtido  $[\text{Zr}(\text{HPO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$  foi levado à estufa (110°C/24h) para secar, apresentando diâmetro de partícula médio de 180  $\mu\text{m}$  e área superficial determinada pelo método B.E.T de 234  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  (Castro *et al.*, 2000).

#### Imobilização da lipase em fosfato de zircônio

O fosfato zircônio foi previamente tratado com  $\gamma$ -aminopropiltrietoxissilano ( $\gamma$ -APTS) e ativado com glutaraldeído, de acordo com metodologia descrita anteriormente (Porto *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003). O procedimento de imobilização consistiu do contato da solução enzimática com o suporte e polietilenoglicol, por um período de 24 horas. Para cada grama de suporte (matéria seca) foram adicionados 350 unidades de atividade da lipase e 200  $\mu\text{L}$  de solução aquosa contendo 50 mg de PEG-1500  $\text{mL}^{-1}$ , sob condições de agitação controlada durante 3h. Em seguida, 10 mL de hexano foram adicionados e a mistura enzima-suporte-aditivo foi incubada à temperatura de 4°C, durante 21 horas. O sistema imobilizado foi filtrado a vácuo e lavado com hexano para remoção da lipase não adsorvida no suporte. Nos filtrados, foram analisados os teores de proteínas totais (Bradford, 1976) e nos derivados imobilizados quantificados os teores de água em um titulador automático Karl Fisher (Modelo Mettler DL 18) e atividade hidrolítica (Soares *et al.*, 1999). O rendimento de imobilização ( $\eta$  %) foi calculado pela Equação 1.

$$\eta (\%) = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (1)$$

em que:  $U_s$  = unidades de atividade enzimática total presente no suporte e  $U_o$  = unidades de atividade utilizadas na imobilização.

#### Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva emulsificado empregando 100 mg de derivado imobilizado, conforme metodologia descrita por Soares *et al.* (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 20 mM, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade foi realizado um controle utilizando 100 mg do suporte seco.

#### Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação da lipase imobilizada em fosfato de zircônio foi determinada pela formação do butirato de butila na reação de n-butanol com ácido butírico em heptano a 37°C com massa seca de enzima imobilizada de 500 mg. Aliquotas de 1 mL foram retiradas do meio reacional em intervalos de tempo pré-determinados. A concentração de butirato de butila foi quantificada por cromatografia em fase gasosa (Cromatógrafo Varian 3800), empregando a coluna 6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh a 60°C e hexanol como padrão interno. O gás de arraste foi o nitrogênio, mantido em um fluxo 30  $\text{mL min}^{-1}$  no interior da coluna. Uma unidade de atividade (esterificação) foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1  $\mu\text{mol}$  de butirato de butila por minuto nas condições do ensaio.

#### Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada na síntese de butirato de butila, sob regime de bateladas consecutivas, com reutilização do sistema imobilizado e utilizando 0,5 g (massa seca) de lipase imobilizada e 20 mL de substrato nas mesmas concentrações adotadas para determinação de atividade de esterificação. As reações foram realizadas em um reator batelada, com agitação, provido de uma cesta construída em tela de aço inox, malha 100 (0,147 mm) com altura de 65 mm e diâmetro de 12 mm. Esta foi suportada em uma placa de alumínio, com orifício central,

colocada na parte superior do reator. As bateladas (24h/37°C) foram monitoradas nos tempos iniciais e finais. Entre as bateladas, a lipase imobilizada foi lavada com 20 mL de hexano para remoção dos reagentes e produtos eventualmente retidos no suporte. Após 1 hora, tempo necessário para evaporação do solvente, a preparação de lipase imobilizada foi reutilizada empregando substrato na mesma concentração utilizada anteriormente. Foram realizados 5 ciclos. A atividade de esterificação foi calculada no final de cada ciclo e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  do biocatalisador.

## Resultados e discussão

### Efeito do aditivo na atividade hidrolítica e sintética dos derivados imobilizados de lipase em ZrP

Lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada por ligação covalente em fosfato de zircônio sinalizado e ativado com glutaraldeído na ausência e presença de PEG-1500. O poder catalítico dos sistemas imobilizados foi comparado em termos de atividade hidrolítica e de esterificação.

A atividade hidrolítica foi quantificada pelo método de hidrólise de triglicerídeos e forneceu informações não só referente à atividade enzimática em meio aquoso como também avaliou a retenção de enzima no suporte de imobilização (Tabela 1).

Nos testes de esterificação foi adotado o modelo reacional constituído de butanol/ ácido butírico/ heptano, avaliando a cinética de conversão dos materiais de partida em éster (Figura 1A, B).

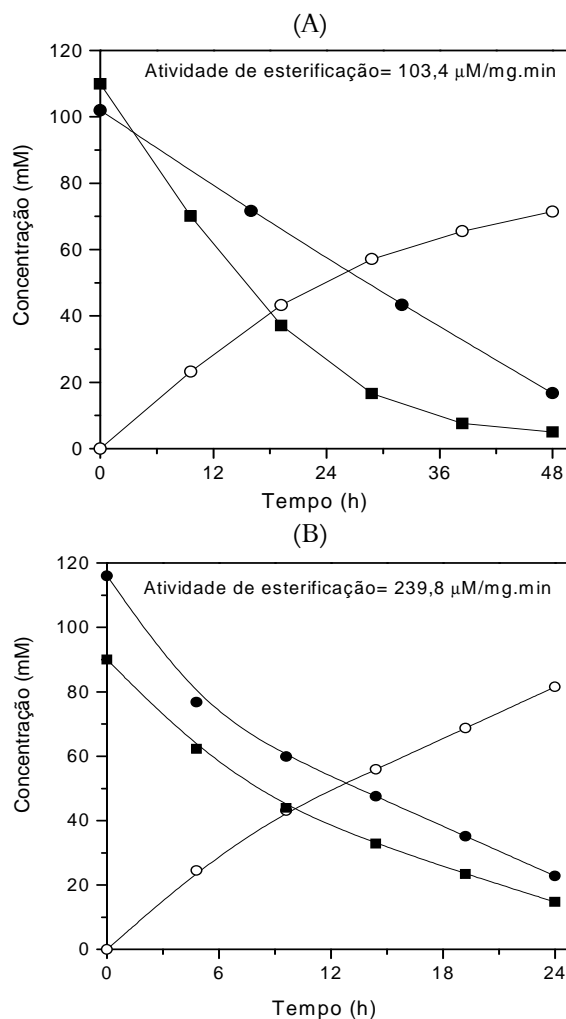
**Tabela 1.** Atividade hidrolítica e rendimento de imobilização ( $\eta$ %) da lipase microbiana em ZrP na presença e ausência de PEG-1500.

PEG-1500	Atividade hidrolítica ( $\text{U mg}^{-1}$ )	Rendimento de imobilização (%)
Ausência	162,8	60,2
Presença	310,6	88,7

Unidades de atividade oferecida no procedimento de imobilização =  $350 \text{ U g}^{-1}$  de suporte.

Com relação à atividade hidrolítica, verificou-se que a utilização do PEG-1500 na etapa de imobilização promoveu um aumento da atividade do sistema imobilizado de 162,8 (controle) para  $310,6 \text{ U mg}^{-1}$  de suporte, conferindo uma recuperação total da atividade oferecida na etapa de imobilização ( $\eta = 88,7\%$ ). Esse resultado foi superior ao descrito por Soares et al. (2001) e Soares et al. (2002) empregando a mesma técnica, mas utilizando como suporte de imobilização sílica de porosidade controlada. De acordo com esses autores, foi obtido rendimento de imobilização da ordem de 59,6%, produzindo uma preparação catalítica com  $109,5 \text{ U mg}^{-1}$  de atividade hidrolítica.

Com relação à atividade catalítica em meio orgânico, a Figura 1A mostra que, no caso da utilização do controle (lipase imobilizada em ZrP na ausência de aditivo), a máxima concentração obtida para o butirato de butila foi de 70 mM, após 48 horas de reação, correspondendo a uma atividade de esterificação da ordem de  $103,4 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Quando se empregou a lipase imobilizada na presença de PEG-1500 (Figura 1B), verificou-se que a velocidade de reação foi significativamente maior ( $239,8 \mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), favorecendo a obtenção de uma concentração máxima de butirato de butila (81 mM) em um menor período de reação (24 horas).



**Figura 1.** Formação do butirato de butila (O) a partir de n-butanol (●) e ácido butírico (■) catalisada pela lipase imobilizada em ZrP na ausência (A) e presença de PEG-1500 (B).

Esses resultados evidenciam o efeito estabilizante do PEG-1500 e confirmam dados da literatura, os quais indicam um aumento considerável da atividade catalítica por meio do tratamento do suporte com polímeros orgânicos ou proteínas não enzimáticas.

(Reetz *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002). Esses tipos de materiais provavelmente protegeram a enzima de efeitos de agregação ou de desnaturação devido à presença dos silanos usados na formação da matriz.

Comportamento semelhante foi obtido por Wu *et al.* (2001) empregando PEG juntamente com óxido propileno para aumentar a hidrofobicidade e introduzir um braço espaçador na estrutura do suporte. A atividade específica máxima da lipase de *Candida rugosa* imobilizada foi duas vezes superior na esterificação do ácido oleico e lauril álcool em hexano.

Estudos realizados por Soares *et al.* (2003) indicaram uma influência bastante satisfatória do PEG-1500 sobre as atividades hidrolítica e sintética da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada sinalizada com  $\gamma$ -APTS e ativada com glutaraldeído. A adição desse aditivo resultou em uma atividade hidrolítica de 198,5 U mg<sup>-1</sup> de suporte na hidrólise do azeite de oliva emulsificado. Para o derivado imobilizado na ausência do aditivo, a atividade hidrolítica foi quatro vezes inferior, da ordem de 57,5 U mg<sup>-1</sup>. Comportamento semelhante foi observado na atividade de síntese do butirato de butila. Com o derivado imobilizado (controle), obteve-se uma atividade de esterificação de 161 U mg<sup>-1</sup> de suporte, bastante inferior ao derivado imobilizado na presença de PEG que apresentou atividade sintética de 363 U mg<sup>-1</sup>.

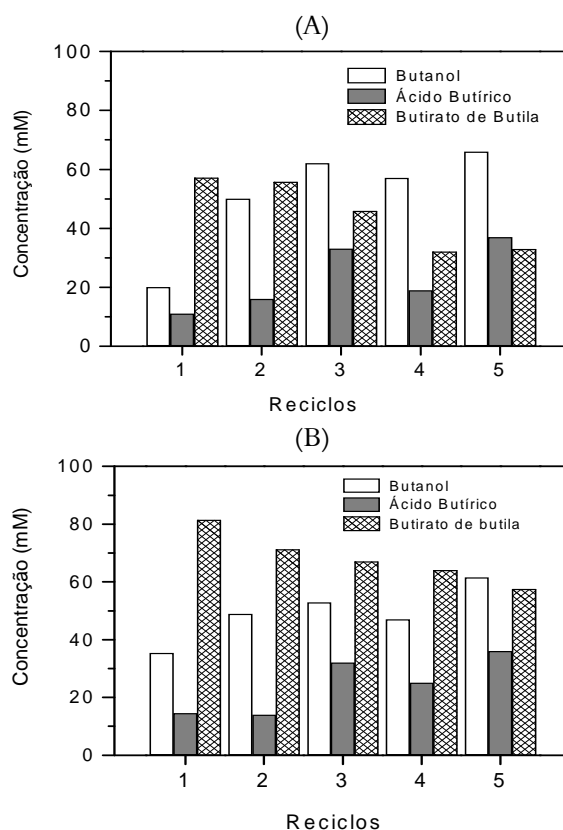
Peroxidase de rabanete (horseradish peroxidase) foi imobilizada em argila pilarizada com elevada concentração de alumina por adsorção física para obtenção do complexo enzima-argila no tratamento de efluentes ricos em compostos fenólicos (Cheng *et al.*, 2006). A adição de PEG aumentou significativamente a eficiência de remoção de compostos fenólicos e reduziu a concentração necessária de enzima imobilizada para a remoção desses compostos, com eficiência de 90%. Empregando sistema imobilizado na ausência de PEG, a remoção de compostos fenólicos foi de apenas 20%. Esse comportamento se deve, provavelmente, à formação de um microambiente no derivado imobilizado mais favorável ao acesso do substrato, com conseqüente aumento da velocidade de reação quando comparado com o desempenho da enzima imobilizada na ausência de aditivo.

A utilização de PEG na estabilização de enzimas não se limita apenas a sistemas imobilizados, mas também em enzimas livres (Maruyama *et al.*, 2004). Maruyama *et al.* (2004) avaliaram a influência de PEG na reação de alcoólise enzimática do acetato de vinila com 2-fenil-1-propanol na presença de líquido iônico [Bmim][PF<sub>6</sub>] (1-butil-3-metilimidazólio

hexafluorofosfato) empregando lipase microbiana de *Pseudomonas cepacia*. A conversão em acetato de 2-fenil-1-propila foi superior a 50%, após 6 horas de reação a 45°C. Empregando lipase na ausência do aditivo, a conversão foi inferior a 5%, nas mesmas condições experimentais. A elevada conversão em acetato de 2-fenil-1-propila foi creditada a elevada solubilidade e dispersão do complexo PEG-lipase no meio reacional.

#### Estabilidade operacional

O perfil de estabilidade operacional dos derivados imobilizados em ZrP na ausência e presença de PEG-1.500 foram estimados por meio de testes de esterificação em bateladas consecutivas (24h/37°C) e as concentrações dos materiais de partida e produto ao final de cada reciclo são apresentados nas Figuras 2A e B.



**Figura 2.** Perfil das concentrações de butanol e ácido butírico na síntese de butirato de butila catalisada pela lipase imobilizada em ZrP na ausência (A) e presença de PEG-1500 (B), em bateladas consecutivas (ciclos de 24h/37°C).

Para o controle (Figura 2A), ao final do primeiro reciclo, a concentração molar de butirato de butila no meio reacional foi de 57 mM, o que equivale a uma conversão molar dos materiais de partida em produto de aproximadamente 50%. Nas bateladas

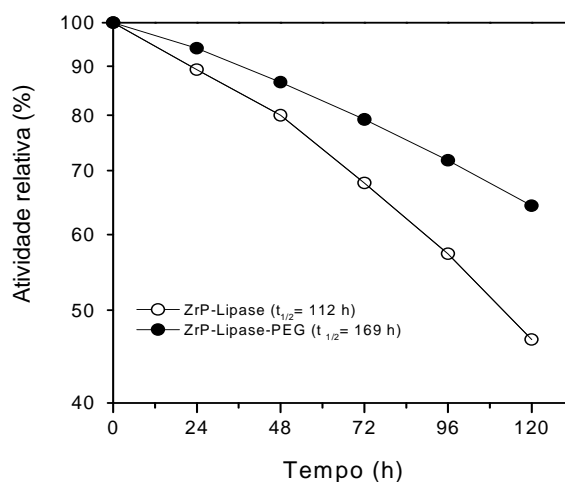
seguintes, a produção de éster foi gradativamente reduzida para valores inferiores a 30 mM, com conseqüente redução da conversão molar dos reagentes para níveis próximos a 25%.

No caso da lipase imobilizada em ZrP na presença de PEG, constatou-se um comportamento bastante similar; entretanto, a redução de atividade ocorreu de forma mais lenta. De maneira geral, a lipase imobilizada manteve sua atividade original por 120 horas (5 ciclos de 24 horas), sendo constatado, após esse período, uma redução média na porcentagem de conversão dos reagentes em 30%.

O sistema imobilizado na presença do aditivo PEG-1500 resultou em uma maior atividade de esterificação após consecutivas bateladas, provavelmente devido às interações entre grupos hidrofóbicos da enzima com o aditivo que promoveu a formação de um microambiente mais favorável ao acesso dos materiais de partida e reduziu a regeneração dos reagentes (reação inversa). Resultados similares foram descritos por Noel e Combes (2003), que observaram uma elevada redução da solubilidade da lipase de *Rhizomucor miehei* em meio tamponado na presença de PEG-1500, decorrente das interações hidrofóbicas entre a enzima e o aditivo. Apesar do seu caráter hidrofílico, a presença do aditivo no sistema imobilizado aumentou o caráter hidrofóbico do derivado imobilizado, aumentando o coeficiente de partição dos substratos aos poros do suporte. Para o derivado imobilizado na ausência de PEG, toda a água produzida na reação migrou para o interior do biocatalisador, deslocando o equilíbrio para a reação inversa.

Para estimativa do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), as atividades relativas foram graficadas em função do tempo (Figura 3), revelando um tempo de meia-vida de 112 horas para o derivado imobilizado obtido na ausência de PEG-1500, enquanto que o derivado preparado na presença desse aditivo revelou um tempo de meia-vida de 169 horas.

Com os resultados dos testes catalíticos em regime de batelada consecutiva foi possível confirmar que a lipase imobilizada obtida na presença de PEG-1500, além de apresentar uma atividade catalítica maior, foi o sistema imobilizado mais estável. Esses resultados indicam que a estratégia proposta foi eficiente, promovendo um aumento da ordem de 1,5 vezes no tempo de meia-vida da preparação experimental de lipase imobilizada em ZrP.



**Figura 3.** Estabilidade operacional da lipase imobilizada em ZrP na ausência e presença de PEG-1500 na reação de esterificação do butanol com ácido butírico em regime de bateladas consecutivas (24h/37°C).

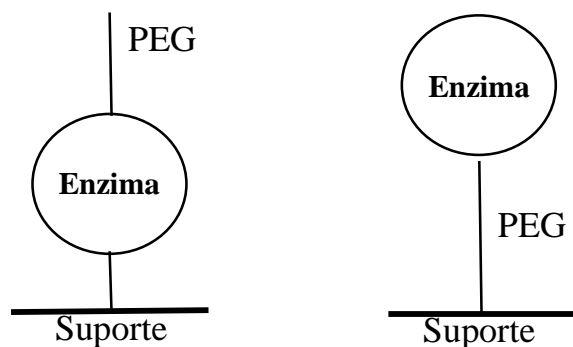
A utilização de PEG-1500 como braço espaçador em meio orgânico torna-se, portanto, uma das novas estratégias para estabilizar o sistema imobilizado em reações de síntese, provavelmente devido ao fato desse braço espaçador minimizar as interações hidrofóbicas e atrações eletrostáticas entre a proteína e o suporte (Harris, 1992; Soares et al., 2001).

#### Interações entre Polietilenoglicol-Lipase-ZrP

Os resultados experimentais obtidos sugerem que a presença do aditivo PEG-1500 modifica as interações entre a lipase e o fosfato de zircônio, produzindo alterações no rendimento da imobilização e na reação de síntese do butirato de butila. Embora não se tenha uma caracterização da superfície ativada do suporte em presença do PEG ou do conjunto enzima-PEG que permita identificar a distribuição espacial desses componentes, algumas conformações podem ser esperadas nesses sistemas, como: ligação direta da enzima ao agente bifuncional (glutaraldeído) como braço espaçador seguida da associação do PEG, ou a ligação do PEG diretamente ao suporte ativado, tendo parte da enzima oclusa no seu interior (Figura 4). Em ambos os casos, o aditivo recobre o sistema, conferindo-lhe maior rendimento tanto na imobilização quanto na reação de formação de ésteres.

O recobrimento com PEG representa um compromisso entre as forças atrativas de ligação ao suporte, e as forças repulsivas devido ao efeito estérico produzido pela interação das cadeias do polímero em solução. Sabe-se que na sua forma livre em geral o PEG tende a agregar proteínas em solução, o que possivelmente deve promover a oclusão das enzimas, e a ligação da camada protetora

do polímero ao suporte. De acordo com a literatura, polietilenoglicol é solúvel em água, tolueno e muitos solventes; entretanto insolúvel em hexano, éter e etilenoglicol (Harris, 1992). No caso do procedimento de imobilização adotado, as etapas de lavagem do sistema imobilizado realizadas com hexano para a retirada de resíduos alcançaram o objetivo desejado sem promover o desligamento da enzima do suporte devido à proteção da cadeia pendular do aditivo, confirmando assim a insolubilidade do PEG em hexano. No caso específico dessa etapa, o uso desse aditivo macromolecular tem mostrado efeitos estabilizantes na atividade do sistema imobilizado. Por outro lado, a condição de solubilidade de PEG-1500 em outros solventes favoreceu a reação padrão de síntese de ésteres adotada neste trabalho, na qual o substrato utilizado teve como base o solvente orgânico heptano. Esse fato pode ter favorecido o aumento do tempo de meia-vida do sistema imobilizado de 112 para 169 horas quando foi utilizada a estratégia da adição de PEG para minimizar os efeitos negativos de resistência difusionais.



**Figura 4.** Esquema que representa as possíveis interações entre o aditivo (PEG), lipase e o suporte.

## Conclusão

As lipases são enzimas versáteis para diversas biotransformações em meios não convencionais. Nessas aplicações, as lipases são preferivelmente usadas na sua forma imobilizada. Entre as inúmeras opções de suporte, de potencial importância tem sido a exploração de novos materiais inorgânicos como os fosfatos de zircônio, tório e nióbio, que possuem importantes propriedades de troca iônica e apresentam afinidade compatível para serem usados como matrizes de imobilização. De acordo com a metodologia tradicional, o suporte é funcionalizado com  $\gamma$ -APTS, seguido da ativação com glutaraldeído. Essa etapa geralmente acarreta uma redução da

atividade original da enzima, sendo normalmente recomendado à adição de agentes estabilizantes. Neste trabalho, resultados promissores foram obtidos quando a enzima lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em fosfato de zircônio (ZrP) na presença de polietilenoglicol (PEG-1500). Essa metodologia forneceu derivados imobilizados mais ativos e estáveis quando comparados com aqueles obtidos sem adição de PEG-1500. É provável que o aumento da atividade da lipase imobilizada em ZrP na presença de PEG-1500 seja devido à influência do equilíbrio entre as superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas do PEG, enzima e suporte. A tecnologia de obtenção de fosfato zircônio é simples e de baixo custo, sendo uma alternativa bastante atraente sob o ponto de vista técnico-econômico para substituir matrizes inorgânicas comerciais, como sílica de porosidade controlada.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro recebido do CNPq e Fapesp.

## Referências

- BOSLEY, J.A. *Supported enzyme*. European Patent 424,130. Depósito em 18/10/1990 e publicada em 24/4/1991.
- BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248, 1976.
- CASTRO, H.F. *et al.* Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipases. *Braz. J. Chem. Eng.*, São Paulo, v. 17, n. 4/7, p. 849-857, 2000.
- CHENG, J. *et al.* Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res.*, Lyngby, v. 40, n. 2, p. 283, 2006.
- FABER, K. *Biotransformation in organic chemistry: A textbook*, 3. ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 1997.
- GONÇALVES, A.M. *et al.* Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 24, n. 1-2, p. 60, 1999.
- HARRIS, J.M. *Poly (Ethylene glycol) Chemistry: biotechnical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992.
- MARUYAMA, T. *et al.* Poly(ethylene glycol)-lipase complexes that are highly active and enantioselective in ionic liquids. *Org. Biomol. Chem.*, Cambridge, v. 2, p. 1239, 2004.
- NOEL, M.; COMBES, D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 33, p. 299, 2003.
- PORTO, T.F. *et al.* Atividade catalítica e estabilidade



- operacional da lipase microbiana imobilizada em fosfato de zircônio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 14., Natal, 2002. CD-Rom.
- REETZ, M.T. *et al.* Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 49, p. 527, 1996.
- ROCHA, J.M.S. *et al.* Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 66, p. 61, 1998.
- SOARES, C.M.F. *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 77/79, p. 745, 1999.
- SOARES, C.M.F. *et al.* Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 91/93, p. 703, 2001.
- SOARES, C.M.F. *et al.* Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 98/100, p. 863, 2002.
- SOARES, C.M.F. *et al.* Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 832, 2003.
- TRINTAFYLLOU, A.O. *et al.* Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 45, n. 5, p. 406, 1995.
- VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, Amsterdam, v. 9, n. 4-6, p. 113, 2000.
- WEHTJE, E. *et al.* Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 41, n. 5, p. 171, 1993.
- WU, J.C. *et al.* Enhanced activity of *Candida rugosa* lipase modified by polyethylene glycol derivatives. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 211, 2001.
- YAMANE, T. *et al.* Intermolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene. Factors affecting activity of pure enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 36, n. 10, p. 1063, 1990.

Received on February 02, 2006.

Accepted on November 28, 2006.