

## DESEMPENHO DA MATRIZ HÍBRIDA SiO<sub>2</sub>-QUITOSANA NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE MICROBIANA DE *Candida rugosa*

Aline S. Simões, Rodrigo Y. Mori, Raquel Faria e Heizir F. de Castro\*

Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, CP 116, 12602-810 Lorena – SP, Brasil

Adriano A. Mendes

Universidade Federal de São João Del-Rei, CP 56, 35701-970 Sete Lagoas – MG, Brasil

Recebido em 9/12/09; aceito em 3/8/10; publicado na web em 16/11/10

PERFORMANCE OF HYBRID MATRIX SiO<sub>2</sub>-CHITOSAN TO IMMOBILIZE MICROBIAL LIPASE FROM *Candida rugosa*. Lipase from *Candida rugosa* was immobilized by covalent attachment on hybrid SiO<sub>2</sub>-chitosan obtained by sol-gel technique. A comparative study between free and immobilized lipase was provided in terms of pH, temperature, kinetic parameters and thermal stability on the olive oil hydrolysis. The pH and temperature for maximum activity shifted from 7.0 and 45 °C for the free lipase to 7.5 and wide range of temperature (40-50 °C) after immobilization. Kinetics parameters were found to obey Michaelis-Menten equation and K<sub>M</sub> values indicated that immobilization process reduced the affinity of enzyme-substrate; however K<sub>d</sub> values revealed an increase of thermal stability of lipase.

Keywords: immobilization; lipase; SiO<sub>2</sub>-chitosan.

### INTRODUÇÃO

Os processos que utilizam lipases são especialmente atraentes em função das diferentes aplicações desta enzima.<sup>1-14</sup> As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação e interesterificação, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento.<sup>1,5-14</sup> Para uma aplicação eficaz, é recomendado o uso da enzima na sua forma imobilizada. A imobilização da lipase tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima, auxiliando também na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial para a condução de reações.<sup>8-17</sup>

Diferentes materiais naturais, sintéticos orgânicos, inorgânicos e híbridos com distintas características de tamanho, forma e densidade têm sido empregados para a imobilização de lipases.<sup>14-24</sup> Entre esses, matrizes híbridas de natureza orgânica e inorgânica têm apresentado particular interesse comercial nos últimos anos, devido às suas diferentes características e aplicações.<sup>14-17</sup> Diversos compostos orgânicos têm sido empregados na síntese destas matrizes, porém os biopolímeros se mostram promissores devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais.<sup>14-24</sup> Precursores silanos, tais como tetraetilortossilicato (TEOS)<sup>14-22</sup> e tetrametilortossilicato (TMOS),<sup>23,24</sup> têm sido amplamente empregados na síntese de matrizes híbridas e a biocompatibilidade destes precursores com diversos polímeros, e tais como álcool polivinílico,<sup>14-17</sup> celulose,<sup>18</sup> carragenana<sup>19</sup> e quitosana,<sup>20-23</sup> é reportada na literatura.

Quitosana, um biopolímero proveniente da desacetilação da quitina, é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose.<sup>25-27</sup> É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As principais fontes de obtenção deste biopolímero são carapaças de crustáceos, como caranguejo, lagosta, sirí, camarão, que são resíduos da indústria pesqueira e a sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado. Este biopolímero possui estrutura molecular quimicamente semelhante à celulose,

diferenciando-se somente nos grupos funcionais.<sup>27</sup> Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura destes biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH<sub>2</sub>) no carbono 2 da estrutura da quitosana.<sup>25,27</sup>

Independente da estratégia utilizada, na preparação de uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado.<sup>14-24</sup> O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros.<sup>19,28</sup> Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto.<sup>19</sup> Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico.<sup>15,16</sup>

O presente trabalho teve como objetivo testar uma matriz alternativa para imobilização da lipase de *Candida rugosa*. A matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana foi preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor silano tetraetilortossilicato (TEOS). Lipase microbiana de *Candida rugosa* foi imobilizada nessa matriz por ligação covalente e as propriedades bioquímicas (pH e temperatura) foram determinadas empregando-se a metodologia de planejamento experimental. Este método tem-se mostrado útil no desenvolvimento e otimização de diversos processos e permite ainda a obtenção de modelos matemáticos, que possibilitam o levantamento e a comprovação de hipóteses científicas que buscam explicar relações de causa e efeito entre os resultados experimentais e as variáveis em estudo.<sup>13,29</sup> Testes adicionais foram ainda efetuados para determinar as propriedades cinéticas e estabilidade térmica da lipase de *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiais

Os experimentos foram realizados com lipase microbiana de *Candida rugosa* (tipo VII) adquirida da Sigma Chemicals Co (St.

\*e-mail: heizir@dequi.eel.usp.br

Louis, MO, EUA), com atividade específica declarada de 924 U/mg de proteína (biureto). Os materiais e reagentes utilizados foram azeite de oliva virgem de baixa acidez (marca Carbonell, adquirido em mercado local); goma arábica em pó, pura (Synth); tetraetilortossilicato (TEOS) e quitosana em flocos adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis-EUA); polietilenoglicol (PEG 1500, Synth); epicloridrina (Sigma Chemicals Co.). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

### Preparação do suporte SiO<sub>2</sub>-quitosana

O suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-quitosana foi preparado conforme metodologia adaptada de Paula *et al.*,<sup>12</sup> pela mistura de 5 mL tetraetilortossilicato (TEOS), 5 mL de etanol, 6 mL de solução alcoólica contendo quitosana 2% (m/v) e 0,1 mL de ácido clorídrico concentrado. Essa mistura foi aquecida e mantida sob agitação magnética em banho a 60 °C durante 40 min. Em seguida, a mistura foi transferida para um molde de silicone (21,5 x 21,5 cm) e levado à secagem a temperatura ambiente até completa solidificação do material sol-gel. O suporte foi então triturado até que o material passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 mesh, sendo utilizada a fração que ficou retida em peneira de 60 mesh. Em seguida, o suporte foi ativado com solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (100 mM e pH 7,0) na proporção massa de suporte:volume de solução de 1:10 e a mistura foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente.<sup>11</sup> O suporte ativado foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão e, em seguida, levado à estufa (60 °C) por 24 h.

### Imobilização da enzima

O suporte ativado foi embebido em hexano (1:10) e mantido sob agitação branda durante 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se o excesso de hexano e adicionou-se a lipase numa razão mássica enzima:suporte de 1:4. Polietilenoglicol (PEG-1500) foi adicionado como estabilizante da enzima, na proporção de 100 µL/g de suporte. O sistema foi mantido sob refrigeração a 7 °C por 12 h. Ao final, o sistema imobilizado foi filtrado a vácuo e armazenado sob refrigeração a 7 °C.

### Determinação da atividade hidrolítica e recuperação da atividade no suporte

A atividade hidrolítica da enzima livre e do sistema imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares *et al.*<sup>30</sup> 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 em 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Os resultados de atividade hidrolítica foram expressos em unidades por grama de sólido (enzima livre ou sistema imobilizado). A atividade recuperada (η%) foi calculada pela Equação 1:

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

em que: U<sub>0</sub> = unidades de atividade oferecidas na imobilização; U<sub>s</sub> = unidades de atividade enzimática no sistema imobilizado.

### Delineamento experimental

A influência do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada foi avaliada segundo um planejamento

experimental 2<sup>2</sup> estrela rotacional com quatro pontos axiais e quatro replicatas no ponto central. Os níveis reais e codificados das variáveis em estudo estão apresentados na Tabela 1. Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos Programas Statistica versão 5 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Corporation, USA).

**Tabela 1.** Níveis reais e codificados para as variáveis pH e temperatura, avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional

Variáveis	Níveis						
	Reais	Codificadas	-α	-1	0	1	+α
pH		x <sub>1</sub>	5,6	6,0	7,0	8,0	8,4
Temperatura (°C)		x <sub>2</sub>	36	40	50	60	64

### Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades iniciais das reações de hidrólise foram determinadas empregando substratos contendo proporções entre 10 a 50% (m/v) de azeite de oliva em solução aquosa de goma arábica (7% m/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos variando entre 372 a 1860 mM, estimadas de acordo com a metodologia descrita por Soares *et al.*<sup>30</sup> As constantes cinéticas K<sub>M</sub> e V<sub>max</sub> foram estimadas pelo Programa *Enzyme Fitter* (Leatherbarrow, R. J., 1987, Elsevier, Biosoft, Amsterdam, The Netherlands).

### Estabilidade térmica

Lipases livre e imobilizada foram incubadas a 50 °C em tampão fosfato (100 mM, pH 7,0). Em intervalos pré-determinados, as amostras foram retiradas e determinadas as atividades hidrolíticas residuais na hidrólise da emulsão do azeite de oliva.<sup>30</sup> Os tempos de meia-vida foram calculados pelo método de ajuste exponencial.<sup>31</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Imobilização da lipase no suporte híbrido

Adotando-se o procedimento de imobilização descrito na parte experimental e partindo de um carregamento de 0,25 g de lipase/g de suporte, foram obtidos derivados com atividade hidrolítica de 668 U/g de suporte, correspondendo a 40,7% de atividade recuperada. Esse valor é similar aos descritos na literatura para suportes epóxi com propriedades híbridas como, por exemplo, sílica-álcool polivinílico (SiO<sub>2</sub>-PVA) ativados com epicloridrina.<sup>14</sup>

### Propriedades bioquímicas da LCR livre e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana

Os resultados obtidos no planejamento estrela rotacional para avaliação do efeito das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da LCR livre e imobilizada estão ilustrados na Tabela 2. As estimativas dos efeitos, erros-padrão e do valor de *p* para as respostas analisadas são apresentadas na Tabela 3.

Para a lipase livre, os valores de atividade hidrolítica variaram entre 4956 a 12296 U/g e os valores mais elevados foram obtidos no ponto central (pH = 7,0 e 50 °C). Verifica-se que para a variável temperatura (x<sub>2</sub>) tanto seu termo linear, como quadrático, apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança. No entanto, para a variável pH apenas o termo quadrático foi significativo estatisticamente. O termo pH linear, bem como a interação entre pH e temperatura não foram estatisticamente significativas (*p* > 0,1).

Os valores de atividade hidrolítica, para a lipase imobilizada,

**Tabela 2.** Matriz e resultados do planejamento estrela rotacional

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Atividade hidrolítica (U/g)	
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	pH	Temperatura (°C)	LCR livre	LCR imobilizada
1	-1	-1	6,0	40	8953	387
2	1	-1	8,0	40	10463	891
3	-1	1	6,0	60	6994	391
4	1	1	8,0	60	4304	430
5	0	0	7,0	50	12296	700
6	-1,414	0	5,6	50	7747	433
7	1,414	0	8,4	50	5625	729
8	0	-1,414	7,0	36	9169	668
9	0	1,414	7,0	64	5918	307
10	0	0	7,0	50	12482	859
11	0	0	7,0	50	11190	870
12	0	0	7,0	50	10652	784

**Tabela 3.** Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão e valores de *p* para o planejamento estrela rotacional

	LCR livre			LCR imobilizada		
	Efeitos	Erro padrão	<i>p</i>	Efeitos	Erro padrão	<i>p</i>
Média	116545	± 599	0,000	803	± 29,57	0,0000
x <sub>1</sub> (Linear)	-	-	-	240	± 41,82	0,0010
x <sub>1</sub> (Quadrático)	-4688	± 948	0,0113	-227	± 46,76	0,0028
x <sub>2</sub> (Linear)	-3179	± 948	0,0564	-241	± 41,82	0,0011
x <sub>2</sub> (Quadrático)	-3830	± 948	0,037	-321	± 46,76	0,0004
x <sub>1</sub> -x <sub>2</sub>	-	-	-	-233	± 59,13	0,0076

<sup>a</sup>significativo ao nível de 95%

variaram entre 307 a 891 U/g. As atividades mais elevadas também foram obtidas em pH 7,0 e temperatura entre 40-50 °C. Verificou-se ainda que os termos linear e quadrático das variáveis pH e temperatura, bem como a interação entre essas variáveis apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança.

A partir dos resultados dispostos na Tabela 3, foi possível compor os modelos estatísticos incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, conforme apresentados nas Equações 2 e 3. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos (pH linear e interação pH e temperatura) foram excluídos do modelo.

$$A_1 \text{ (U/g)} = 11655 - 2344x_1^2 - 1590x_2 - 1915x_2^2 \quad R^2 = 0,8575 \quad (2)$$

$$A_2 \text{ (U/g)} = 803 + 120x_1 - 114x_1^2 - 121x_2 - 160x_2^2 - 116x_1x_2 \quad R^2 = 0,9594 \quad (3)$$

em que: A<sub>1</sub> é a atividade da lipase LCR livre (U/g); A<sub>2</sub> é a atividade da lipase LCR imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA (U/g); x<sub>1</sub> é o valor codificado da variável pH e x<sub>2</sub> é o valor codificado da variável temperatura.

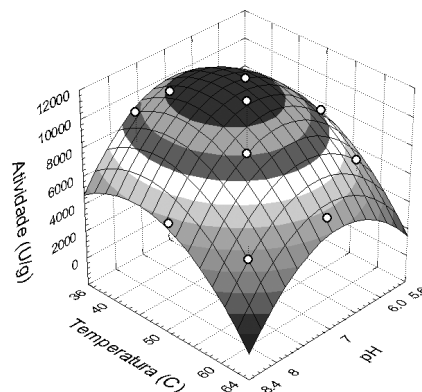
O teste de significância para os modelos estatísticos compostos (Tabela 4) indicou significância ao nível de 99% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste para ambos os modelos (nível de confiança de 95%). Verifica-se ainda pelos valores de R<sup>2</sup> que as equações ajustadas foram capazes de explicar a variabilidade dos valores experimentais entre 85,75 a 95,94%. Desta forma, considerou-se que

os modelos estatísticos obtidos foram adequados para descrição da atividade hidrolítica em função do pH e temperatura, obtendo-se as superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 1 e 2.

**Tabela 4.** Análise de variância para o ajuste do modelo proposto que representa a atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada

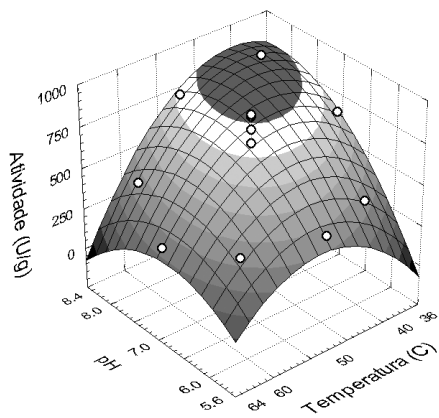
Lipase	Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	<i>p</i>
Livre	Modelo	6930. 10 <sup>4</sup>	3	2310.10 <sup>4</sup>	16,05	0,001
	Resíduo	1151.10 <sup>4</sup>	8	1439.10 <sup>3</sup>		
	Falta de ajuste	9194.10 <sup>3</sup>	5	1839. 10 <sup>3</sup>	2,38	0,2531
	Erro puro	2317.10 <sup>3</sup>	3	7723.10 <sup>2</sup>		
Imobilizada	Cor total	8081.10 <sup>4</sup>	11			
	Modelo	4952.10 <sup>2</sup>	5	99047	28,21	0,0004
	Resíduo	21068	6	3511		
	Falta de ajuste	2473	3	824	0,13	0,9342
	Erro puro	18595	3	6198		
	Cor total	5163.10 <sup>2</sup>	11			

A superfície de resposta referente à lipase LCR livre (Figura 1) apresentou um “topo”, ou seja, um valor de pH (7,0) e de temperatura (45 °C) para os quais a atividade hidrolítica foi máxima. Esse ponto máximo foi próximo ao relatado por diversos autores para LCR, porém com uma temperatura ótima superior às citadas por estes autores.<sup>15,30,31</sup> A existência de ponto de máximo de atividade de uma enzima livre em função do pH e da temperatura é comum, sendo que a determinação dos valores ótimos normalmente é feita por metodologias de análise tradicionais, ou seja, univariadas.<sup>15</sup> Neste caso, o uso de planejamento experimental pode ser vantajoso,<sup>11,29</sup> resultando na redução do número de experimentos necessários para a otimização e verificação da possibilidade de interação entre pH e temperatura.

**Figura 1.** Superfície de resposta de acordo com o modelo predito para a atividade hidrolítica da LCR livre em função de pH e temperatura

A superfície traçada para a lipase imobilizada apresentou “forma de sela”, como mostrado na Figura 2. Este tipo de superfície é mais complexa e apresenta valores máximos e mínimos para várias combinações das variáveis independentes. A superfície correspondente à LCR imobilizada ilustra a contribuição do efeito quadrático da temperatura e da interação entre as variáveis estudadas.

Normalmente, quando enzimas são imobilizadas em suportes sólidos, há deslocamento da temperatura ótima para valores mais elevados, uma vez que ocorrem interações entre a enzima e o supor-

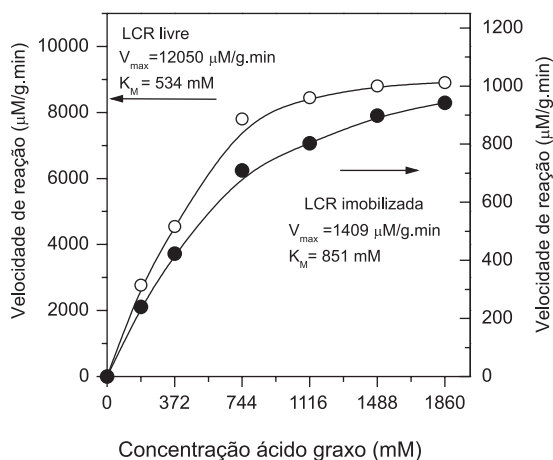


**Figura 2.** Superfície de resposta de acordo com o modelo predito para a atividade hidrolítica da LCR imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana em função de pH e temperatura

te, as quais frequentemente resultam em uma estrutura mais rígida da molécula proteica, conferindo à conformação globular ativa do biocatalisador maior estabilidade frente à temperatura.<sup>11</sup> Este deslocamento da temperatura ótima para valores mais elevados pode ser observado na Figura 2, especialmente para valores de pH mais alcalinos. Neste caso, fica bem evidenciado o efeito de interação entre o pH e a temperatura, que forneceu regiões de elevada atividade em pH superior a 7,5 para uma ampla faixa da temperatura (40 a 50 °C).

#### Parâmetros cinéticos da LCR livre e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana

Os perfis das curvas de velocidade de reação das preparações de lipase livre e imobilizada em função da concentração de ácido graxo são apresentados na Figura 3. Verifica-se que o aumento na concentração do substrato de 372 para 1116 mM resultou em um incremento significativo nas velocidades de reação de ambas as preparações de lipase ensaiadas. Para concentrações de substrato superiores a 1488 mM, a atividade enzimática da lipase tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten.



**Figura 3.** Influência da concentração do substrato na velocidade de reação da lipase de *Candida rugosa*. As velocidades de reação plotadas no eixo esquerdo são referentes à lipase livre (○) e as do eixo direito referentes à lipase imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana (●)

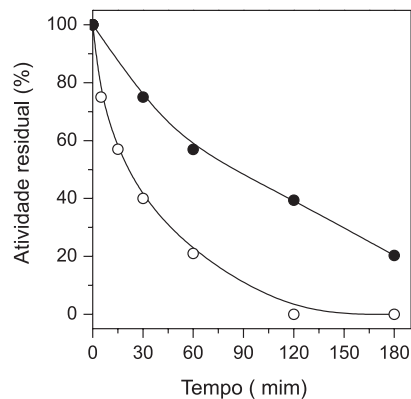
Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  aparentes foram calculados com o auxílio do programa *Enzyme Fitter*, sendo obtidos os valores de  $V_{max}$  iguais

a 12050  $\mu\text{mol/g min}$  (LCR livre) e 1409  $\mu\text{mol/g min}$  (LCR imobilizada). Os valores de  $K_M$  determinados foram 534 mM (LCR livre) e 851 mM (LCR imobilizada), indicando uma mudança da afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada.

Esse comportamento é geralmente observado para enzimas imobilizadas em função dos efeitos de interação enzima e suporte e dependem do processo de imobilização. Segundo Georgio e Hubbell,<sup>32</sup> três formas de interação podem ser distinguidas: a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e, as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima.

#### Estabilidade térmica da LCR livre e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana

Experimentos foram ainda efetuados para se estimar a constante de inativação térmica ( $K_d$ ) e o tempo de meia-vida da LCR livre e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana incubadas a 50 °C, como ilustrado na Figura 4. Verifica-se pelo perfil das curvas que a lipase na forma solúvel foi totalmente inativada após 120 min de incubação, enquanto a lipase na forma imobilizada ainda manteve 40% da atividade original nesse mesmo período de tempo. Esses dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da LCR.



**Figura 4.** Atividade residual da LCR livre (○) e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana (●) em função do tempo de exposição sob a temperatura de 50 °C

A partir desses resultados, calcularam-se a constante de inativação térmica ( $K_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima (Tabela 5).

**Tabela 5.** Constantes de inativação térmica ( $K_d$ ) da lipase livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ )

Lipase	$K_d$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)
Livre	3,65	0,19
Imobilizada	0,43	1,63

Esses parâmetros confirmam a influência positiva do método de imobilização na estabilidade térmica da lipase, revelando um tempo de meia-vida de 0,19 e 1,63 h, respectivamente, para lipase livre e imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana (Tabela 5). Esse valor corresponde a um aumento da estabilidade térmica de aproximadamente 9 vezes da lipase imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana.



**Tabela 6.** Propriedades catalíticas da lipase microbiana de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes contendo sílica ou quitosana na sua composição

Característica	SiO <sub>2</sub> -PVA	Sílica de porosidade controlada	Quitosana	SiO <sub>2</sub> -quitosana
Método de imobilização	Ligação covalente	Ligação covalente	Adsorção	Ligação covalente
Agente de ativação do suporte	Glutaraldeído	Glutaraldeído	Ausente	Epicloridrina
Atividade recuperada (%)	82 <sup>b</sup>	18 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>
pH ótimo	8,0	7,5	6,0	8,4
Temperatura ótima (°C)	55	50	45	40-50
Estabilidade térmica 50 °C (t <sub>1/2</sub> , h)	0,64	3,0	1,0	1,63
Referência	15	30	31	Este trabalho

<sup>a</sup>hidrólise do azeite de oliva emulsificado; <sup>b</sup>hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila.

### Comparação das propriedades catalíticas da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes

A imobilização da enzima lipase em suportes orgânicos e inorgânicos, particularmente de *Candida rugosa*, tem sido amplamente descrita na literatura.<sup>9,15,30,31</sup> Para uma melhor avaliação das propriedades obtidas pela amostra de lipase imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana, na Tabela 6 são apresentados dados comparativos para diferentes derivados imobilizados de *Candida rugosa*. Para este propósito, foram selecionados suportes que apresentam propriedades similares ao suporte testado neste trabalho como, por exemplo, quitosana e sílica, que são os componentes do suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-quitosana. Além disso, o suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-PVA foi também utilizado como parâmetro de comparação, por diferir do suporte testado neste trabalho apenas pelo componente orgânico, álcool polivinílico (PVA) ao invés de quitosana.

Em termos de atividade recuperada, a matriz testada neste trabalho apresenta potencial superior às matrizes orgânicas e inorgânicas, como quitosana e sílica de porosidade controlada (SPC). Entretanto, a atividade recuperada do derivado preparado por imobilização em SiO<sub>2</sub>-PVA (82%) foi superior à obtida no suporte SiO<sub>2</sub>-quitosana (40%), possivelmente devido à diferente morfologia e natureza química entre os suportes híbridos.

Com exceção da lipase imobilizada em quitosana pura, todos os derivados preparados apresentaram deslocamentos para valores de pH mais alcalinos. Esse comportamento está relacionado com possíveis mudanças conformacionais e alterações do estado de ionização e dissociação da enzima em seu macroambiente. Normalmente, mediante imobilização, o pH ótimo das reações catalisadas pelas lipases muda parcialmente para pH mais alcalino, tendo em vista que o ataque nucleofílico da serina é auxiliado pelo comportamento básico da histidina. Este comportamento é devido à abertura parcial da hélice (tampa) mediante imobilização, expondo a histidina no centro ativo mais diretamente aos prótons da solução e, portanto, somente as condições fracamente ácidas levam força não protonada do anel imidazólio necessário para este comportamento básico.<sup>2-4,11</sup>

Observa-se ainda que a lipase imobilizada em suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-PVA foi o sistema que apresentou máxima atividade hidrolítica acima de 50 °C, o que é muito favorável, pois temperaturas mais elevadas favorecem a cinética da reação. Entretanto, a estabilidade térmica mais elevada foi constatada para a lipase imobilizada em sílica de porosidade controlada (t<sub>1/2</sub> = 3,00 h) e a menor para o derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-PVA. Entre os suportes orgânicos e híbridos, a estabilidade térmica mais elevada foi constatada para o derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-quitosana (t<sub>1/2</sub> = 1,63 h). Este derivado foi 3 vezes mais estável que o derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-PVA. A boa congruência geométrica da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana, relacionada com o melhor alinhamento entre a enzima e o suporte,

melhorou a estabilidade térmica do biocatalisador em relação ao derivado preparado com SiO<sub>2</sub>-PVA. A reatividade de suportes ativado com glutaraldeído é relativamente superior aos suportes ativado via epóxi, o que pode acarretar em uma má orientação da enzima durante a imobilização (imobilização randômica) por distorção da estrutura ativa da enzima.<sup>33</sup>

### CONCLUSÕES

Lipase microbiana de *Candida rugosa* foi imobilizada em partículas de SiO<sub>2</sub>-quitosana previamente ativadas por epicloridrina. Os resultados obtidos revelaram um bom desempenho desse suporte, fornecendo derivado imobilizado com características bioquímicas e cinéticas adequadas para emprego na hidrólise de óleos vegetais. As propriedades bioquímicas foram analisadas por meio de um planejamento fatorial e os resultados obtidos revelaram que a atividade da lipase livre foi otimizada para pH = 7,0 e temperatura = 45 °C. Para a lipase imobilizada, o valor de atividade ótima foi obtido para valores de pH superiores a 7,5 para uma ampla faixa de temperatura (40-50 °C). O comportamento cinético da enzima livre e imobilizada foi explicado pela Equação de Michaelis-Menten e os valores de K<sub>M</sub> encontrados mostram uma mudança da afinidade da lipase pelo substrato após o processo de imobilização. A estabilidade térmica apresentou um aumento de aproximadamente 9 vezes da lipase imobilizada em SiO<sub>2</sub>-quitosana em relação à enzima livre.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS

- de Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
- Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller R.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 237.
- Cyglér, M.; Schrag, J. D.; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 205.
- Vergèr, R.; *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32.
- de Castro, H. F.; Anderson, W. A.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 544.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
- Mendes, A. A.; de Castro, H. F.; Pereira, E. B.; Furigo Jr., A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 296.
- Sharma, R.; Chist, Y.; Benerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, *9*, 627.
- Mendes, A. A.; Rodrigues, D. S.; Filice, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Palomo, J. M.; *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10721.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.

11. Zanin, G. M.; Moraes, F. F. Em *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*; Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 4, p. 35-85.
12. Balcão, V. M.; Paiva, A. L.; Malcata, F. X.; *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 392.
13. Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J. M.; Haas, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 113.
14. Freitas, L.; Da Rós, P. C. M.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1068.
15. Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; Bruno, L. M.; de Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 35.
16. Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; de Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *61*, 229.
17. Freitas, L.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1360.
18. Xie, K.; Yu, Y.; Shi, Y.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 799.
19. Shchipunov, A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *268*, 68.
20. Ayers, M. R.; Hunt, A. J.; *J. Non-Cryst. Solids* **2001**, *285*, 123.
21. Song, R.; Xue, R.; He, L. H.; Liu, Y.; Xiao, Q. L.; *Chin. J. Polym. Sci.* **2008**, *26*, 621.
22. Smitha, S.; Shajesh, P.; Mukundan, P.; Warriar, K. G. K.; *J. Mater. Res.* **2008**, *23*, 2053.
23. Retuert, J.; Quijada, R.; Arias, V.; Yazdani-Pedram, M.; *J. Mater. Res.* **2003**, *18*, 487.
24. Cazacu, M.; Dragan, S.; Vlad, A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *88*, 2060.
25. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19.
26. George, M.; Abraham, T. E.; *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 1.
27. Krajewska, B.; *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126.
28. Gill, I.; Ballesteros, A.; *Trends Biotechnol.* **1998**, *18*, 282.
29. Boyaci, I. H.; *Biochem. Eng. J.* **2005**, *25*, 55.
30. Soares, C. M. F.; de Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77/79*, 745.
31. Pereira, E. B.; Zanin, G. M.; de Castro, H. F.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2003**, *20*, 343.
32. Georgio, G.; Hubbell, J. A. Em *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*; Mcketta, J. J., ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993, vol. 45, p. 142-176.
33. Mendes, A. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.