

Imobilização de lipase de *Candida rugosa* em micropartículas de quitosana utilizando diferentes agentes ativadores

Immobilization of *Candida rugosa* lipase in chitosan microparticles using different agents activators

Lucas Miguel Altarugio

Ernandes Benedito Pereira, ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, MG

Submetido em 17/04/2015

Revisado em 01/07/2015

Aprovado em 15/12/2015

Resumo: Lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada utilizando duas técnicas de imobilização: adsorção física e ligação covalente em micropartículas de quitosana. O presente trabalho teve como objetivo estudar e comparar a atividade desempenhada pela lipase livre e imobilizada sob diferentes condições, fornecendo uma atividade ótima para pH e temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica e operacional em reação de hidrólise de azeite de oliva. A imobilização foi realizada por adsorção física, ou seja, pelo contato da enzima ao suporte e por ligação covalente utilizando diferentes agentes bifuncionais glutaraldeído e glicoxal para ligação multipontual da enzima ao suporte. O melhor desempenho foi observado na técnica de ligação covalente utilizando o glicoxal como agente ativador, o qual apresentou atividade de 150 U mg⁻¹ apresentando resultados de 40 e 47% superior aos tratamentos feitos por adsorção física e glutaraldeído respectivamente. Quanto ao testes realizados para pH e temperatura de atividade ótima houve um deslocamento de pH para 7,5 na lipase imobilizada por ligação covalente e aumento da faixa de temperatura que variou entre 45-50°C para os derivados imobilizados, enquanto para a lipase livre para T=37°C e pH 7,0. Os parâmetros cinéticos foram calculados obedecendo a cinética de Michaelis-Menten, cujos resultados indicaram que na faixa de concentração estudada (10 a 50%) não se detectou nenhuma inibição possível. Os valores de Km determinados mostram que a lipase imobilizada e ativada com glicoxal é a que apresenta maior afinidade pelo substrato (Km = 835 mM). Nos estudos de estabilidade térmica e operacional demonstraram que a imobilização foi favorável para aumentar o tempo de meia vida da lipase imobilizada (variou de 0,93h a 1,77h) em relação à lipase livre (0,18 h).

Palavras chave: lipase, imobilização, micropartículas de quitosana, parâmetros cinéticos.

Abstract: Lipase from *Candida rugosa* was immobilized by physical adsorption and covalent binding on chitosan microparticles. The objective of this work was to study and compare the activity performed by free and immobilized lipase under

different conditions, in order to achieve the optimal activity for pH and temperature, kinetic parameters and thermal and operational stability hydrolysis reaction of olive oil. The immobilization was carried out by physical adsorption by contact of the enzyme and support or by covalent bonding using the bifunctional agent glutaraldehyde and glyoxal for the enzyme in the multipoint connection support. The best performance was observed in the covalent bonding technique using glyoxal as an activator agent, which showed activity of 150 U mg⁻¹ presenting results from 40 and 47% higher than the treatments made by physical adsorption and glutaraldehyde respectively. For the tests for pH and temperature activity optimum there was a shift to pH 7.5 the lipase in the immobilized by covalent bonding and increased temperature range ranging from 45-50 °C for immobilized derivatives, while for the free lipase for T = 37° C and pH 7.0. The kinetic parameters were calculated obeyed Michaelis-Menten Kinetics. The results indicated that the studied concentration range (10 to 50%) can not detect any inhibition. The Km values determined show that the immobilized and activated with glyoxal lipase is one that has a higher affinity for the substrate (Km = 835 mM). In studies of thermal and operational stability showed that the immobilization was favorable to increase the half-life of the immobilized lipase (range of 0,93h the 1,77h) in relation to the free lipase (0.18 h)..

Keywords: lipase, immobilization, chitosan of microparticles, the kinetic parameters.

Introdução

O mercado mundial de enzimas cresce a cada dia em diferentes campos de aplicação, tais como, indústria química, farmacêutica, cosmética ou de alimentos. As pesquisas nessa área levaram a uma melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas, e juntamente com a engenharia e biologia molecular, conduziram a novas aplicações de várias enzimas, como por exemplo, proteases, acilases, oxidases, amilases, glicosidases, celulases e lipases ^[1]. Cabe destacar dentro das classes das hidrolases, as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol éster hidrolase) que são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster, com maior especificidade para triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa. São bastante versáteis e tem várias aplicações tanto em processos hidrolíticos quanto em processos de síntese (indústrias de alimentos-modificação de óleos e gorduras, síntese de compostos orgânicos e áreas ambiental, industrial e biotecnológica ^[2,3,4].

As enzimas apresentam como principais vantagens: alta estabilidade, alta eficiência catalítica, elevada especificidade, além de permitir a obtenção de produtos com melhor qualidade quando comparado a outros métodos catalíticos ^[5,6]. Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados à

estabilidade e ao custo limitam a utilização desses biocatalisadores. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização ^[1]. A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo ^[7,8].

Enzimas imobilizadas têm sido amplamente empregadas em indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, por favorecerem principalmente a reutilização e aumentarem a estabilidade, diminuindo assim os custos do processo. Suportes como microesferas poliméricas são alternativas favoráveis para imobilização de enzimas, pois apresentam facilidade na obtenção, são produzidas com uma grande variedade de composições e podem ser modificadas por diversos métodos de ativação. Além disso, as microesferas apresentam grande área superficial e, dependendo do processo de reticulação do polímero, podem apresentar maior porosidade, aumentando a capacidade para imobilização de enzimas ^[9,10].

Diferentes materiais naturais, sintéticos orgânicos e inorgânicos com distintas características de tamanho, forma e densidade têm sido empregados para a imobilização de lipases ^[11]. Entre esses materiais merece destaque a quitosana um polímero natural, de baixo custo, baixa toxicidade, biocompatível e apresenta propriedades multifuncionais.

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-NH^{3+}$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. O grau de protonação pode ser determinado pela variação da concentração de quitosana. Para uma dada concentração de ácido, o grau de protonação depende do pK do ácido usado para solubilizar a quitosana ^[12]. A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima, um dialdeído muito empregado nessa técnica é o glutaraldeído o qual é amplamente reportado na literatura como agente de ativação em matriz de quitosana ^[13]. O glicoxal é outro dialdeído de menor braço espaçador e vem sendo descrito na ativação de matriz de quitosana utilizando diversas enzimas como xilanase ^[14], lacase ^[15,16], fosfatase ^[17], no entanto alguns

desses trabalhos demonstram melhor eficiência na retenção da atividade enzimática frente ao glutaraldeído. Dessa maneira torna-se atrativo a possibilidade de utilizar o glioxal na ativação do suporte de quitosana na imobilização de lipase.

O presente trabalho teve por objetivo obter micropartículas de quitosana para imobilização da lipase de *Candida rugosa* (LCR) por adsorção física e ligação covalente (glioxal e glutaraldeído), sendo determinadas as propriedades bioquímicas (pH e T), as propriedades cinéticas (K_m e V_{max}), estabilidade térmica e operacional da lipase na forma livre e imobilizada.

Procedimentos Experimentais

Materiais

Os experimentos foram realizados com lipase microbiana comercial de *Candida rugosa* adquirida da Sigma-Aldrich. Os materiais e reagentes utilizados foram azeite de oliva virgem de baixa acidez (menor que 0,5%) marca Carbonell, adquirido em mercado local, goma arábica em pó, pura (Dinâmica); glioxal 40% (Dinâmica), glutaraldeído 25% (Dinâmica), ácido acético (Dinâmica) e quitosana em pó. Os demais materiais e reagentes empregados foram de grau analítico.

Síntese das micropartículas

A quitosana a 2,5% (m/v) foi dissolvida em ácido acético 5%, em seguida foi vertida sobre solução básica de hidróxido de sódio 1M e homogeneizada com mixer por 5 segundos na proporção 1:2 respectivamente. A solução foi ajustada a um pH entre 8 a 8,5 sob constante agitação magnética e utilizando ácido acético. Numa etapa seguinte, foram adicionados 1,5 mL de glutaraldeído por grama de suporte (quitosana), sendo novamente homogeneizada com mixer por 5 segundos e deixada em repouso por 24h a 4°C. As partículas foram lavadas por filtração a vácuo para retirar o excesso de glutaraldeído e seguiram para estufa a 37°C por um período de 48h.

Imobilização: preparo do suporte para adsorção e ativação

Foi preparado uma solução de 20 mg.mL⁻¹ de *Candida rugosa* (LCR), utilizando tampão fosfato 0,1M com pH 8,0, em seguida o suporte foi colocado em contato na proporção 5:1 (suporte:enzima) e permaneceu sob agitação

magnética por 1h e foi armazenada a 4°C por 24h. Após essa etapa, a solução foi colocada novamente sob agitação de 1h seguindo 3 tratamentos: a) o primeiro não recebeu nenhum agente de ativação (somente adsorção); b) o segundo recebeu 1% glutaraldeído; c) e o último 0,5% de glioxal. Os derivados imobilizados foram separados por filtração a vácuo, sendo que o filtrado foi coletado para a quantificação das proteínas não imobilizadas. As micropartículas seguiram para secagem em liofilizador.

Análise de Proteína

A análise de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando como padrão BSA.

Caracterização Morfológica

Para análise do tamanho, forma e superfície das partículas, livres de enzimas ou imobilizadas foi realizado microscopia de varredura eletrônica (MEV).

Determinação da atividade hidrolítica e recuperação da atividade no suporte

A atividade enzimática da lipase na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al., ^[18]. Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite:água) e 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). Com a finalidade de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, à 37°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado a massa conhecida da preparação de lipase (cerca de 5 mg da lipase livre ou 50 mg do derivado imobilizado), mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37°C, por 5 min. Após o período de incubação foram adicionados 15 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) para interromper a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,02 M) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmoles g⁻¹ min⁻¹ (U g⁻¹).

A atividade recuperada foi calculada pela equação 1 ^[19]:

$$\eta (\%) = (U_s \times 100) / U_0 \quad (1)$$

U_0 = unidades de atividade oferecidas na imobilização; U_s = unidades de atividade enzimática no sistema imobilizado.

Influência do pH

As atividades das lipases livre e imobilizada foram estudadas, utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 4,0 a 8,0, com incremento de 0,5 variando-se o pH do tampão acetato de sódio e fosfato de sódio (0,1 M) utilizado na temperatura de 37°C para enzima livre e 45°C para enzima imobilizada.

Influência da Temperatura

Foi verificada influência da temperatura na atividade das lipases livre e imobilizada, empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, nas temperaturas de 30 a 70°C, variando 5°C e utilizando pH 7,0.

Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades iniciais das reações de hidrólise da lipase livre e imobilizada foram determinadas empregando substratos de concentração de 10 a 50% (372 a 1860 mM em ácidos graxos) de azeite de oliva em solução aquosa de goma arábica 7% (m/v). As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram calculados com auxílio do programa Enzyme Fitter.

Estabilidade térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase livre e imobilizada foi determinado por meio da incubação de diversas amostras da lipase livre (1 mL, 5 mg mL⁻¹) e imobilizada (0,10 gramas, massa seca) livre de substrato numa faixa de temperatura de 37 a 60°C em meio aquoso (0,1 M tampão fosfato, pH 7,0). As amostras foram retiradas após 1h e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 37°C, preparado pelo método de hidrólise do azeite

de oliva e comparado com a atividade inicial. As constantes de desativação (K_d , h^{-1}), foram calculadas pela equação 2 ^[20]:

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (2)$$

A_0 = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após tratamento térmico durante certo período de incubação (t).

Estabilidade Operacional

A lipase imobilizada foi adicionada em erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL da emulsão de óleo de oliva e 5 de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. A reação de hidrólise do azeite de oliva foi realizada a 35°C em shaker incubadora a 150 rpm em bateladas de 12h, após a reação a lipase imobilizada foi filtrada com auxílio de uma bomba a vácuo. O filtrado obtido foi coletado para medir a atividade após essa etapa, o derivado imobilizado foi lavado com tampão fosfato e novamente adicionado na reação ^[21] de acordo com Yang et al., 2010.

Resultados e discussões

Rendimento da imobilização e caracterização morfológica

Agentes de reticulação são substâncias que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter ou intracadeias poliméricas ^[22]. Ao fazer um levantamento bibliográfico em busca de reagentes químicos já empregados como agentes de entrecruzamento de quitosana é possível encontrar uma variedade dessas substâncias, tais como, glutaraldeído, formaldeído, epícloridrina, glioxal, entre outros ^[23]. Ao se empregarem aldeídos monofuncionais (formaldeído) ou bifuncionais (glioxal e glutaraldeído) como agentes de entrecruzamento, a reticulação ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila dos agentes. A reação de eliminação subsequente produz as correspondentes aldiminas ou bases de Schiff ^[23]. A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes.

Na Tabela 1 são mostrados os valores em porcentagens do rendimento da imobilização, onde o tratamento realizado na quitosana utilizando glicoxal como agente reticulante foi o mais eficiente com quase 90%, mostrando que o método aplicado foi satisfatório na retenção dos biocatalisadores. O derivado imobilizado que manteve sua atividade enzimática também foi o glicoxal, mostrando ser menos agressivo na modificação da estrutura tridimensional da proteína assim conservando melhor sua atividade catalítica. A quitosana-glicoxal é um suporte de imobilização promissor devido ao seu baixo custo e por permitir a imobilização de enzimas por interações covalentes multipontuais [24].

Os resultados encontrados neste trabalho se comparam favoravelmente com aqueles reportados na literatura em termos de rendimento de imobilização [25].

Tabela 1. Porcentagens do rendimento de imobilização

	Glicoxal	Glutaraldeído	Adsorção Física
% Imobilização	88,32	78,95	83,25
η (%) Atividade Recuperada	21%	10%	12%

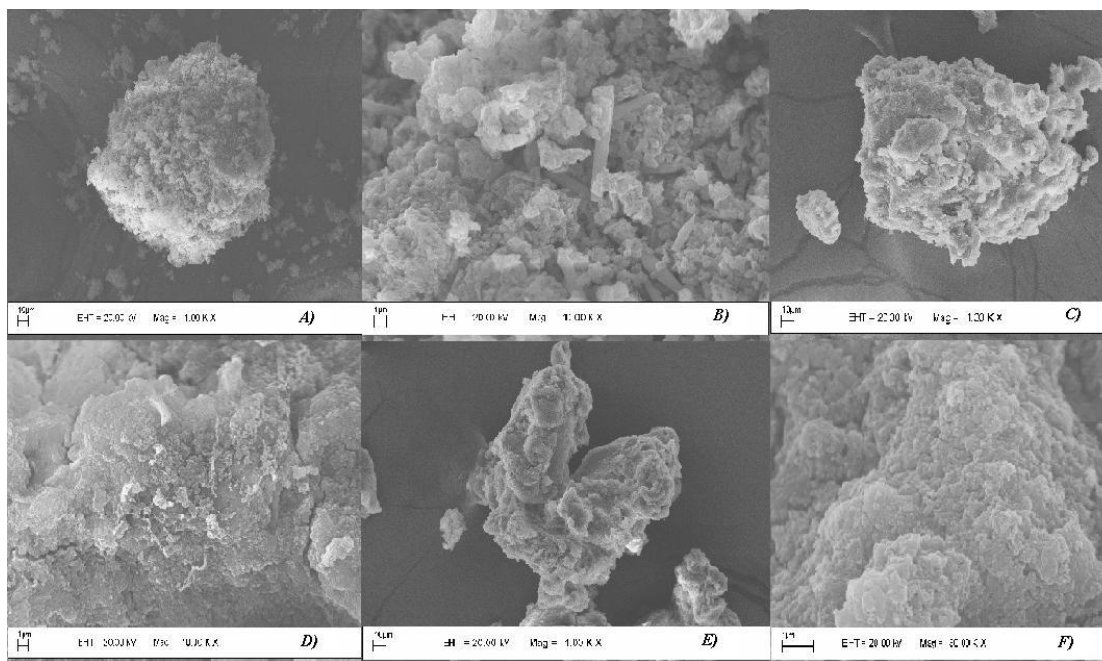


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas livre e carregadas. A) e B) micropartícula livre de enzima. C) e D) Micropartículas com

lipase ativada por glioxal. E) e F) Micropartículas com lipase ativada por glutaraldeído

Após serem secas em estufa, as micropartículas foram maceradas e passaram por uma peneira de 40 mesh, no entanto o diâmetro das partículas foi menor que 425 μm . Na microscopia de varredura eletrônica das partículas evidencia que não apresentaram tamanho uniforme porém observa-se uma superfície muito porosa confirmando a eficiência de tal morfologia na imobilização da LCR.

Caracterização físico-química do derivado imobilizado

A maioria das reações químicas se processa em uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas apresentam um comportamento semelhante às reações catalisadas quimicamente. Porém, as enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica provém da necessidade de que sua estrutura terciária seja mantida, principalmente por um grande número de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas [26, 27]. Se a molécula absorve excesso de energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima ficará desnaturada, perdendo sua atividade catalítica. À medida que a temperatura se eleva o aumento esperado na velocidade, resultante do aumento das colisões entre E + S, é contraposto pelo aumento da velocidade de desnaturação. Conseqüentemente, a curva de atividade-temperatura é o resultado líquido dos efeitos opostos resultantes da elevação da temperatura (aceleração da reação) e do aumento da inativação (desnaturação) [28]. Para a determinação da temperatura ótima das preparações enzimáticas das lipases livre e imobilizadas variou-se a temperatura de incubação entre 30 a 70°C. As lipases imobilizadas apresentaram um deslocamento na atividade ótima entre 45-50°C enquanto a lipase livre teve sua atividade ótima em 37°C, as interações entre a enzima e o suporte sólido colaboram para formação de uma estrutura protéica mais rígida, levando o sítio catalítico da enzima apresentar maior estabilidade sob elevação da temperatura [20], conforme mostrado na Figura 2.

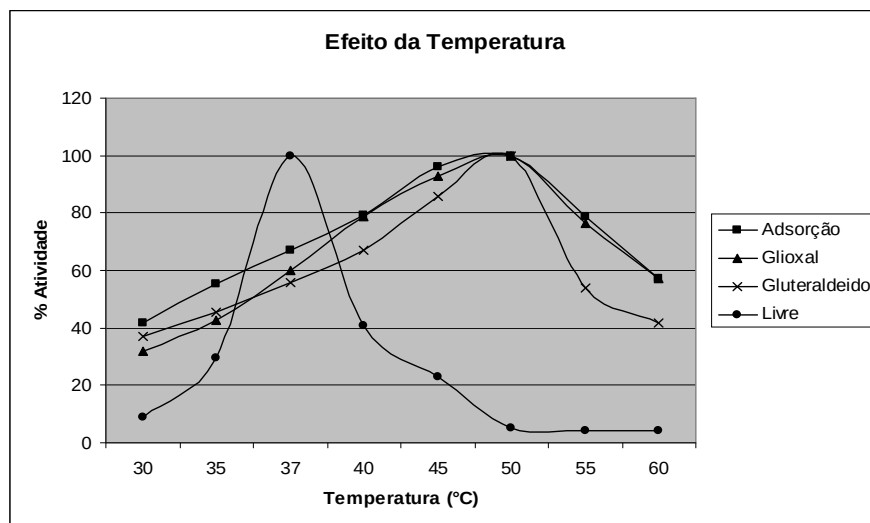


Figura 2. Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da LCR livre (●), imobilizada por adsorção (■), ativada com glioxal (▲) e ativada com glutaraldeído (x).

Quanto ao pH, a maioria das enzimas apresenta um valor de pH característico em que sua atividade é máxima. Para investigar a influência do pH no desempenho catalítico da lipase comercial de *Candida rugosa* (LCR) na reação de hidrólise do óleo de oliva, variou-se o pH de incubação na faixa de 4,0 a 8,0, numa temperatura fixa de 37°C para a enzima livre e 45°C para imobilizada. A variação da atividade relativa em função do pH para as lipases livre e imobilizada em quitosana é apresentada na Figura 2. Observa-se que o processo de imobilização deslocou o pH ótimo da enzima livre para pH mais alcalinos no derivado imobilizado, além disso pode se notar uma maior estabilidade da enzima imobilizada frente ao pH no meio reacional uma vez que ainda retinha cerca de 20 a 30% da atividade em pH 4-4,5. Esse comportamento pode estar relacionado com possíveis mudanças conformacionais da enzima ou alterações de concentração entre as espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxilas, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional (macroambiente) e corrobora o observado na literatura em que muitas vezes os processos de imobilização atuam no sentido de aumentar a estabilidade ao pH [28].

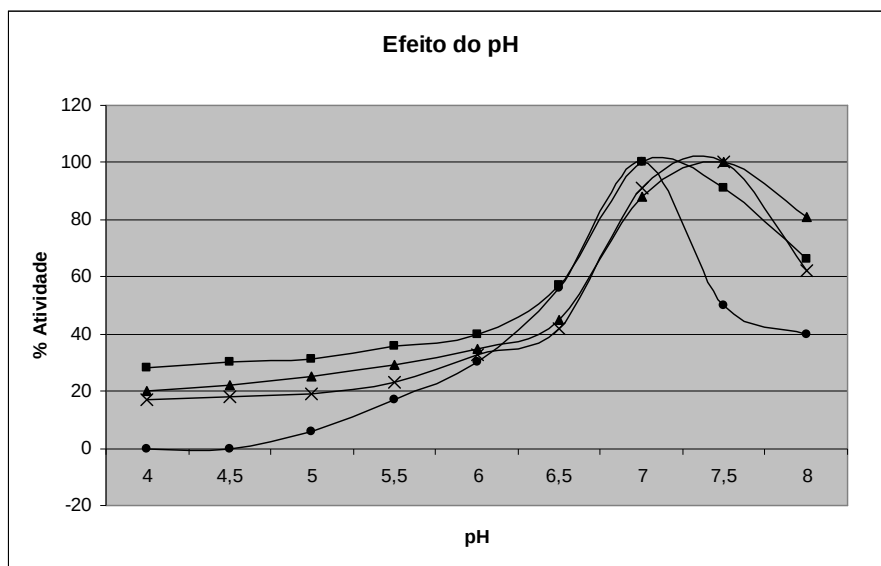


Figura 3. Influencia do pH sobre a atividade hidrolítica da LCR livre (●), imobilizada por adsorção (■), ativada com glicoxal (▲) e ativada com glutaraldeído (x).

Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase

Na Figuras 4 são apresentadas as atividades da lipase livre e imobilizada, respectivamente, em função da concentração de ácidos graxos presentes na emulsão óleo e água contendo diferentes proporções de azeite de oliva (10-50% m/v). Os resultados mostrados na Figura 4 sugerem que as atividades das preparações de lipases em função da concentração de ácidos graxos seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada, não se detectou uma possível inibição por produtos de reação ou pela redução do teor de água ^[27,28].

As constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas com auxílio do programa Enzyme Fitter. Os valores de K_m determinados mostram que a lipase imobilizada e ativada com glicoxal é a preparação enzimática que apresenta maior afinidade pelo substrato ($K_m = 835$ mM). Já a lipase imobilizada e ativada com glutaraldeído foi à preparação que demonstrou menor afinidade pelo substrato ($K_m = 1154$ mM).

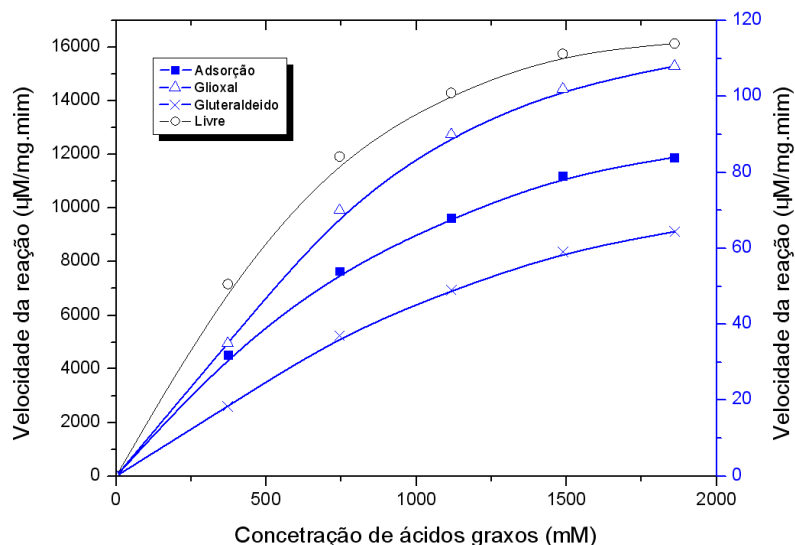


Figura 4. Atividade hidrolítica das lipases em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37°C) para enzima solúvel e (48°C) para sistema imobilizado. LCR livre (●) se refere ao eixo da esquerda; LCR imobilizada por adsorção (■), ativada com glioxal, (▲) e ativada com glutaraldeído (x). Referem-se ao eixo da direita.

Estabilidade térmica

Um aumento de temperatura geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima. Entretanto, a elevação de temperatura e o tempo de exposição também podem promover aumento na taxa de desativação térmica da lipase, portanto, reduzindo a formação de produto^[27]. As atividades residuais das lipases livre e imobilizada, após tratamento térmico por 1h são mostradas na Figura 5 e indicaram que todas as preparações de lipases testadas são termicamente instáveis acima de 45°C, estando praticamente desnaturadas. A partir desses resultados, calcularam-se a constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a lipase livre e imobilizada. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima.

Para efeitos de cálculo, a temperatura escolhida foi de 50°C e o melhor desempenho foi atingido utilizando os tratamentos de ligação covalente os quais apresentaram tempo de meia vida 9 vezes maior em relação à lipase livre. Esses resultados foram bastante similares aos encontrados na literatura com

imobilização da lipase LCR em matriz híbrida de sílica-quitosana ^[11], enquanto quando se utilizou a adsorção física somente 5 vezes mais estável. Tal diferença pode ser atribuída à dessorção da enzima e posterior inativação por desnaturação. Esses resultados são mostrados na Tabela 2. Comportamentos similares têm sido observados para derivados imobilizados de lipase em suportes orgânicos ^[25, 29-30].

Tabela 2. Constantes de inativação térmica das preparações em meio aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0), após 1h de incubação a 50°C.

	LCR livre	Adsorção Física	Glioxal	Glutaraldeído
Kd (h ⁻¹)	3,71	0,74	0,41	0,39
t _{1/2}	0,18	0,93	1,69	1,77

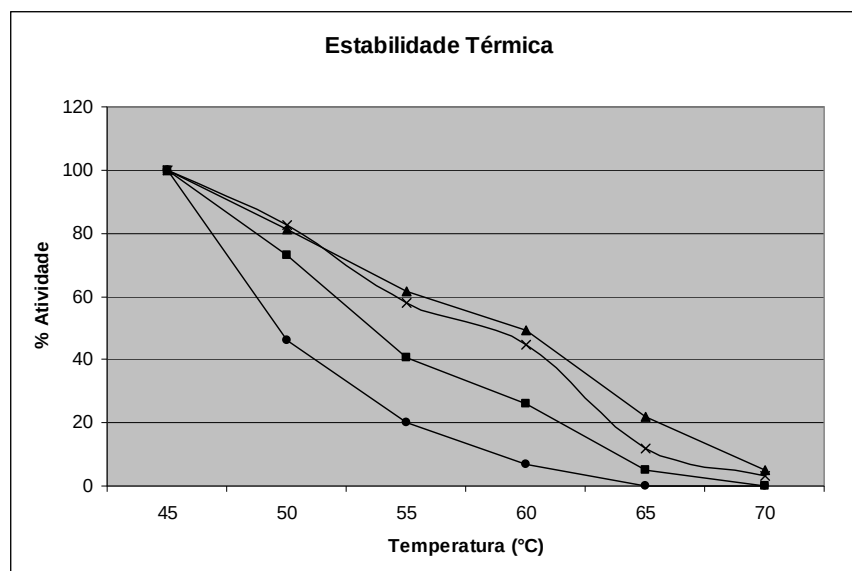


Figura 5. Influência da temperatura de incubação na atividade residual da LCR livre (●), imobilizada por adsorção (■), ativada com glioxal (▲) e ativada com glutaraldeído (x).

Estabilidade Operacional da Lipase Imobilizada

O estudo da estabilidade operacional da lipase imobilizada em quitosana foi realizado em regime de bateladas consecutivas (48 h/ 37 °C/150 rpm). Após 10 ciclos de reações a maior atividade residual foi a do tratamento que utilizou glutaraldeído como agente de ativação apresentando 61,2 % de atividade, seguido do glioxal com 48,4% de atividade, resultados bem próximos foram

obtidos na imobilização de lipase em PEG-sílica-gel ^[20] e também na imobilização utilizando quitosana-TPP como suporte ^[21]. A enzima imobilizada somente por ligação covalente apresentou uma queda de rendimento muito grande podendo se atribuir tal efeito a dessorção da enzima do suporte, ao 7º ciclo o imobilizado já apresentava 5% de atividade residual.

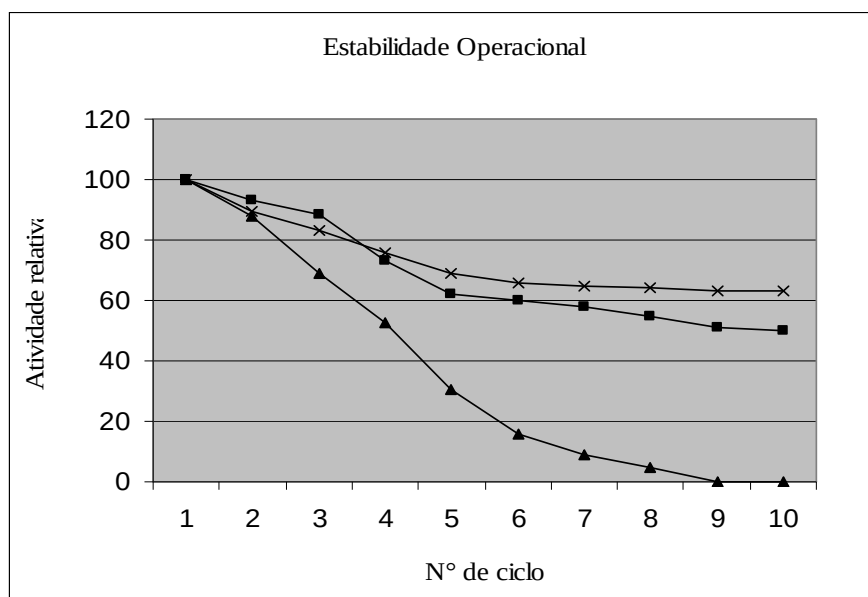


Figura 6. Estabilidade operacional do sistema imobilizado em bateladas consecutivas. LCR imobilizada por adsorção (■), ativada com glicolal (▲) e ativada com glutaraldeído (x).

Conclusões

A quitosana possui importantes propriedades físico-químicas, como porosidade e área superficial, que lhe conferem grande potencial para ser utilizada como matriz de imobilização de catalisadores bioquímicos. Em meio aquoso foi efetuado um estudo comparativo entre lipase livre e imobilizada em termos de pH, temperatura e concentração de substrato. Foram observadas modificações no pH ótimo da enzima imobilizada para um pH básico (8,0) e para valor mais elevado de temperatura (45 °C) quando comparadas com a enzima na sua forma livre (pH =7,0 a 37 °C). Os testes de estabilidade térmica revelaram que o derivado imobilizado apresentou maior estabilidade térmica que a lipase livre. Enquanto a lipase livre foi rapidamente desativada sob temperaturas

superiores a 50°C, a lipase imobilizada apresentou uma inativação térmica bem mais lenta nessas temperaturas. A influência da concentração do substrato na velocidade de reação permitiu deduzir um mecanismo cinético da reação e estimar os valores para K_m a lipase imobilizada e ativada com glicoxal ($K_m = 835$ mM), sendo a preparação enzimática que apresenta maior afinidade pelo substrato, ao passo que a lipase imobilizada e ativada com glutaraldeído foi à preparação que demonstrou menor afinidade pelo substrato ($K_m = 1154$ mM) .

Na imobilização da lipase em micropartículas obtido por diferentes agentes ativadores, os melhores resultados foram encontrados quando o suporte foi reticulado com glicoxal, sendo que, neste caso, a atividade hidrolítica foi de 150 U mg⁻¹, rendimento de imobilização foi 88,32 % e retenção de 21% da atividade. O tempo de meia vida sobre estabilidade térmica dos derivados imobilizados por ligação covalente multipontual apresentou um aumento de 9 vezes sobre a lipase na forma livre (0,18 h) e 5 vezes no tratamento de adsorção física. A estabilidade operacional dos sistemas imobilizados revelou que a ligação por adsorção física apresenta desvantagem por períodos longos de reação, devido a efeitos dessortivos da enzima na matriz de imobilização.

Agradecimentos

Ao PIBICT/ FAPEMIG pela bolsa de Iniciação Científica e a UNIFAL-MG.

Referências

- [1] P. Villeneuve. *Biotechnology Advances*. 25 [6] [2007], Pages 515-536.
- [2] H. F. de Castro; A. A. Mendes; L. Freitas; J. C. Santos. [2010], *Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicações*. 1 ed. SP: Schoba, v.1, p. 275-337.
- [3] B. D. Ribeiro; A. M. Castro; M. A. Z. Coelho; D. M. G. Freira, [2011], *Enzyme Research*, v. 1, p. 1-16.
- [4] P. A. Adlercreutz, [2013]. *Chemical Society Review*, v. 42, p. 6406-6436.
- [5] V. Polshettiwart; R. Luque; A. Fihri; H. Zhu; M. Bouhrara; J. M. Basset. [2011]. *Chemical Review*, v. 11, p. 3036-3075.
- [6] G. Torrel; U. Hanefeld; F. Hollmann. [2015]. *Catalysis Letters*, v. 145, n.1, p. 309-345.

- [7] A. Pandey, A.; S. Benjamin; C. R. Soccol; P. Nigam; N. Krieger; V. T. Soccol (1999). *Biotechnology Apply Biochemistry*, 29, 119-131.
- [8] M. M. Salunkhe; R.V. Nair (2000). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.10, Issue 5, 535–538.
- [9] S. Li; J. Hu; B. Liu. [2004]. *Biosystems*, v.77, p.25.
- [10] S. Wu; B. Liu; S. Li. [2005]. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 237, p. 263.
- [11] A. S. Simões; R. Y. Mori; R. Faria; H. F. de Castro; A. A. Mendes. [2011]. *Química Nova*, v. 34, n. 1, p. 33-38.
- [12] J. E. Santos; J. P. Soares; E. R. Dockal; S. P. Campana Filho; E. T. G. Cavalheiro. [2003]. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, n. 4, p. 242-249.
- [13] A. M. Mendes; P. C. Oliveira; H. F. Castro; R. L. C. Giordano. [2011]. *Química Nova*, v. 2, 1-10.
- [14] A. Manrich; A. Komesu; W. S. Adriano; P. W. Tardioli, R. L. C. Giordano. [2010] *Appl Biochem Biotechnol*. May: 161 (1-8): 455-67. Jan 30.
- [15] H. Cabana; C. Alexandre; S.N. Agathos; J.P. Jones. [2009]. *Bioresource Technology*. Jul: 100 (14): 3447-3458.
- [16] I. R. W. Z. Oliveira; O. Fatibello-Filho; S. C. Fernandes; I. O. Vieira. [2009]. *Química Nova*, vol.32, n. 5, São Paulo.
- [17] R. S. Juang; F. C. Wu; R. L. Tseng. [2001]. *Bioresource Technology* Dec: 80 (3):187-193.
- [18] C. M. F. Soares; H. F. Castro; F. F. Moraes; G. M. Zanin [1999]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, n. 2, p. 745-757.
- [19] G. M. Zanin; F. F. Moraes; S. Saiad; R. C. L. R. Pietro. [2004]. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. *Legis Summa*. Riberão Preto, cap. 4, p.35-38.
- [20] J. Yang; Y. Hu; L. Jiang; B. Zou; R. Jia; H. Huang. [2013]. *Bioch. Eng J.*, 70, 46.
- [21] Z. T. Tang; J. Q. Quian; L. E. Shi. [2007]. *Materials Letters*, 61, p. 37–40.
- [22] J. Berger; M. Reist; J. Mayer; O. Felt; N. A. Peppas; R. Gurny. [2004]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 19.
- [23] A. A. Gonsalves; C. R. M. Araújo; N. A. Soares; M. O. F. Goulart; F. C. Abreu [2011], *Quim. Nova*, V. 34, No. 7, 1215-1223.

- [24] D.S. Rodrigues; A. A. Mendes; W. S. Adriano; L. R. B. Gonçalves; R. L. C. Giordano. [2008]. J Mol Catal B-Enzim, v.51, p.100-109.
- [25] F. M. Gomes; E. B. Pereira; H. F. Castro [2004]. Biomacromolecules, v. 5, n. 1, p. 17-23.
- [26] H. F. Castro; A. A. Mendes; J. C. Santos; C. L. Aguiar. [2004]. Quim. Nova, 27, 146.
- [27] F. M. Gomes; A. V. de Paula; G. S. Silva; H. F. de Castro. [2006]. Quim. Nova, V. 29, No. 4, 710-718.
- [28] G. M. Zanin; F. F. Moraes. [2004]. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**; Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap. 4.
- [29] L. Freitas; A. A. Mendes; H. F. Castro. [2003]. Anais Assoc. Bras. Quim. 52, 124.
- [30] P. C. Oliveira; G. M. Alves; H. F. Castro. [2000]. Bioch. Eng. J., 5, 63.