XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011
SINAFERM 2011

Propriedades morfológicas e físico-químicas da lipase *Candida rugosa* imobilizada em poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

[1]Rebeca Yndira Cabrera Padilla; [1]Joyce Matos da Penha; [1,2]Alini Tinoco ricks; [1,2]Elton Franceschi; [1,2]Alvaro Silva Lima; [1,2]Daniel Pereira Silva; [1,2]Cleide Mara Faria Soares

[1]Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Bairro Farolândia,
CEP: 49032-490, Aracaju-SE - E-mail: yndiracp@yahoo.com
[2]Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 Prédio do ITP - Bairro Farolândia,

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação das propriedades morfológicas e físico-químicas da enzima lipase Candida rugosa (LCR) imobilizada em biopolímero natural poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV. A enzima livre, suporte e LCR imobilizada produzida foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), perda de massa por termogravimétria (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC), composição química por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C. A partir dos resultados obtidos nas análises realizadas foi possível verificar uma provável eficiência na imobilização da LCR em PHBV por adsorção física.

Palavras-chave: LCR imobilizada, MEV, DSC, TGA, FTIR, RMN

INTRODUÇÃO

Os processos enzimáticos obtiveram maior aceitação na área de inovação e desenvolvimento tecnológico, devido à sua especificidade e natureza ecologicamente correta. As lipases livres ou imobilizadas são biocatalisadores versáteis que tem encontrado amplas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica por sua capacidade de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e outras reações (Dandavate *et al*., 2008).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para a estabilização de biocatalisadores, reduzindo de modo geral a inativação por influência da temperatura e/ou por solventes orgânicos, sendo atrativa para o setor industrial considerando o aumento da estabilização da enzima com a finalidade de reuso em diferentes processos (Guisan, 2006).

Os polímeros naturais e sintéticos pertencem a uma classe de suporte muito importante no campo da imobilização de biocatalisadores (Mateo *et al*., 2000). Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente

degradáveis não causando danos ao meio ambiente (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) é uma boa alternativa para ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência, fácil reabsorção, propriedades não tóxicas e por ser considerado ecologicamente correto.

Neste estudo serão avaliadas as propriedades morfológicas e físico-químicas do suporte, da lipase *Candida rugosa* livre (LCR) e imobilizada (LCR-PHBV).

MATERIAL E MÉTODOS

Imobilização da Enzima LCR

A enzima LCR foi imobilizada em PHBV por adsorção física de acordo com o método de Soares *et al*. (2004) com modificações, utilizando uma razão enzima/suporte de 0,3 (p/p).

Caracterização Morfológica e Físico-Química do Biocatalisador

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises das amostras da enzima livre (LCR), do suporte (PHBV) e biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 440i, Leica).

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas DSC do suporte (PHBV) e biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram obtidas em um analisador térmico (modelo DSC-60, Shimadzu), utilizando-se uma razão de aquecimento de 20°C. min^{-1}, até atingir o equilíbrio termodinâmico. A temperatura inicial foi de 30°C e a final de 200°C.

Análise Termogravimétrica (TGA)

As amostras da enzima livre (LCR), do suporte (PHBV) e biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram submetidas à Análise Termogravimétrica (modelo DTG-60H, Shimadzu), tomando por base a perda da massa em função da temperatura. As seguintes condições operacionais foram empregadas: razão de aquecimento de 20°C. min^{-1}, na faixa de temperatura de 30°C a 550°C, com variação de massa de 2 a 6 mg.

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

As amostras da enzima livre (LCR), do suporte (PHBV) e biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram analisadas no equipamento de Análise FTIR (Espectrofotômetro FTIR BOMEM MB-100). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 500 a 4000 cm^{-1}.

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C

As amostras do suporte (PHBV) e biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram caracterizados por espectrometria de ressonância nuclear de ^{13}C, no estado sólido, em um equipamento Variam, espectrômetro de RMN Inova 400 (7,05 tesla). Os espectros foram obtidos empregando-se a sequência de pulso simples e rotação no ângulo mágico (CP-MAS), com intervalo entre os pulsos de 3s, duração do pulso (p/2) de 0,050s.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As propriedades morfológicas e físico-químicas da enzima lipase *Candida rugosa* (LCR) imobilizada em um biopolímero natural poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV serão discutidas neste item. O rendimento de imobilização para o derivado estudado foi de 25% e atividade hidrolítica de 301 U. g^{-1}.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para análise da LCR, do suporte e do biocatalisador imobilizado. Na Figura 1 observa-se a micrografia de grânulos de LCR de uma forma geral, bem como do suporte puro (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (PHBV-LCR). Pode ser observado que o biocatalisador imobilizado LCR-PHBV apresentou uma maior concentração de grânulos em comparação com o suporte puro PHBV, sugerindo a fixação da enzima na superfície do suporte.

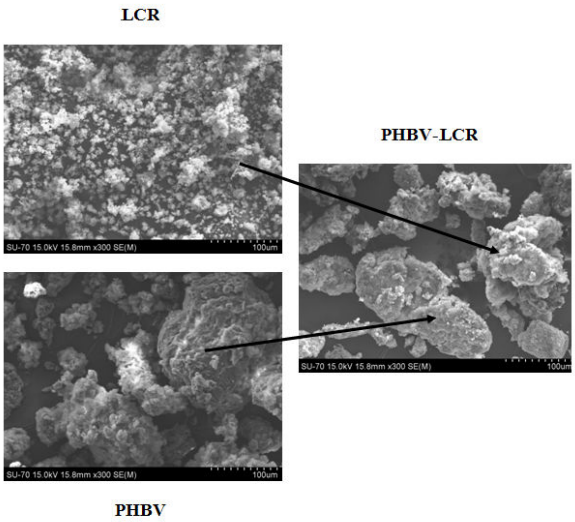

Figura 1. Micrografias de grânulos de enzima livre (LCR), do suporte (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV)

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Figura 2 apresenta a curva DSC do suporte (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV). Deste modo, foi observado comportamentos similares para as duas amostras analisadas, apresentando em ambos os casos um único pico para a faixa de temperatura estudada. Para o PHBV foram determinadas a temperatura de fusão (T_f = 166,60°C) e a entalpia de fusão (ΔH_f = 84,59J.g^{-1}), estes valores foram próximos aos relatados na literatura para o suporte puro (Gonçalves *et al*., 2009). Para o biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) foram determinadas a T_f = 166,80°C e a ΔH_f = 66,43 J.g^{-1}.

Entretanto, e de acordo com os dados, é sugerido a imobilização da enzima no suporte visto que os valores obtidos com a imobilização da enzima LCR por adsorção física no suporte PHBV, comparado aos valores quando na análise com o suporte de forma isolada, absorveu menor quantidade de calor para atingir a temperatura de fusão, este último

praticamente igual ao do suporte. Este fato, possivelmente tenha ocorrido pela diferença causada na condutividade térmica quando com o biocatalisador imobilizado em comparação ao suporte isoladamente, promovendo a diminuição do fluxo de calor.

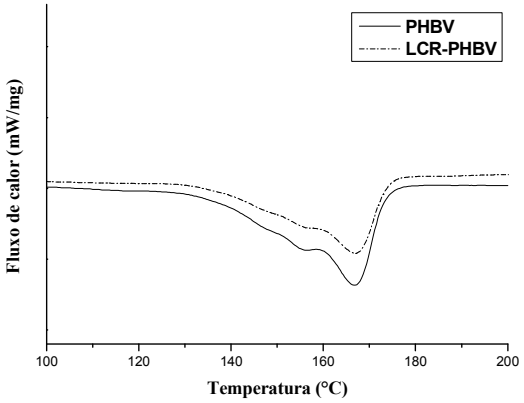

Figura 2. Curvas de DSC durante o aquecimento do suporte (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV)

Termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica o perfil da cada termograma foi dividido em três regiões em função da temperatura: região I (0 a 200°C), região II (200 a 400°C) e região III (400 a 550°C). Observa-se na Figura 3 que na região I para LCR livre a perda de massa foi desde o início, enquanto que para o suporte (PHBV) e para o biocatalisador imobilizado (LCR-PHVB) a perda de massa se manteve praticamente constante, entretanto as temperaturas foram diferenciadas para o PHBV e LCR-PHBV.

Na região II se observa uma elevada perda de massa com o aumento da temperatura para as três amostras. Para o PHVB a degradação máxima ocorreu praticamente até 340°C com a temperatura inicial ($T_{inicial}$) de 254°C, valores estes que corroboram com valores encontrados na literatura onde é indicado que o PHBV é termicamente instável acima de 250°C. Durante o processo de degradação térmica do PHBV, a ruptura da cadeia e a hidrólise conduzem a redução da massa molar e a formação do ácido crotónico (Singh & Mohanty, 2007). Para a LCR-PHVB a máxima degradação ocorreu em 315°C com a $T_{inicial}$ de 250°C.

Na região III pode ser observada que após a degradação térmica do suporte e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHVB) ocorreu uma pequena variação mássica. Para a LCR livre a perda de massa foi ainda substancial na região III, provavelmente este fato esteja associado à decomposição de compostos orgânicos do biocatalisador (Soares *et al.,* 2004).

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

Os espectros no infravermelho (FTIR) obtidos para a enzima livre (LCR), o suporte (PHBV) e o biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) são apresentadas na Figura 4.

A enzima livre (LCR) apresentou um espectro típico de proteínas, com as bandas na faixa de 1650-1540 cm^{-1} associadas ao seu característico grupo amino (CONH) primário e secundário. Estas bandas são muito fracas no espectro para o biocatalisador imobilizado, mais revela a presença do grupo amino da LCR.

Os espectros para o PHBV e o LCR-PHBV apresentam comportamentos semelhantes, observando-se um pequeno incremento nas bandas do biocatalisador imobilizado comparado

ao do suporte, fato que sugere a presença da enzima livre na superfície do suporte, verificando-se uma vez mais a técnica de imobilização por adsorção física.

No espectro do PHBV estão presentes as bandas atribuídas às vibrações de alongamento do grupo C-O-C aproximadamente na faixa de 1245-1319 cm^{-1}, assim como as bandas associadas ao alongamento da dupla ligação C=O aproximadamente na faixa de 1700–1760 cm^{-1} conforme relatado por Gonçalves *et al*. (2009).

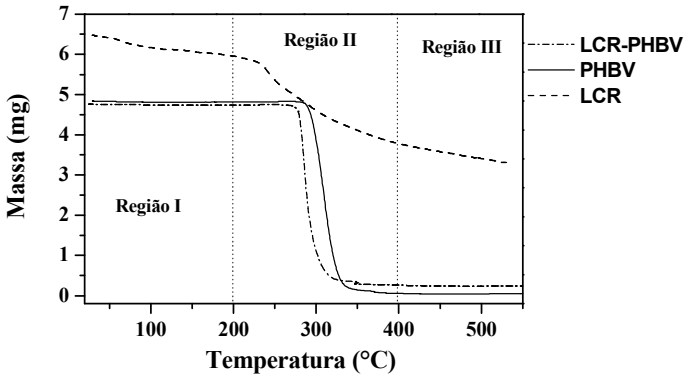

Figura 3. Análise termogravimétrica da enzima livre (LCR), do suporte (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV)

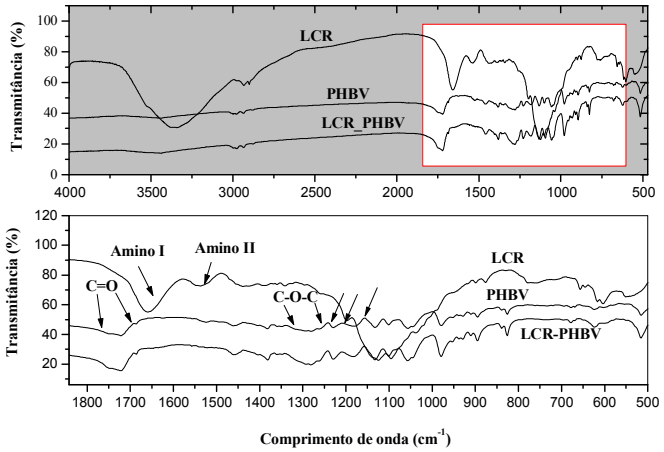

Figura 4. Espectros no infravermelho (FTIR) da LCR livre, do suporte (PHBV) o biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV)

Espectros de RMN de ^{13}C.

Os espectros de RMN ^{13}C do suporte (PHVB) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) estão representados na Figura 5. Ambas as amostras analisadas apresentam comportamentos semelhantes com pequeno deslocamento e diminuição dos picos no biocatalisador imobilizado comparado com o do suporte. Os deslocamentos químicos dos picos de ressonância observados no espectro para o suporte PHBV são similares ao reportado por Slater *et al*. (1999), entretanto foi identificado um pequeno pico na região próxima a 117 ppm, fato ocasionado provavelmente devido à presença de impurezas na composição do suporte.

Nos espectros da Figura 5 foram observados quatro picos de maiores intensidade, foram eles: pico 1, 2, 3 e 4. No caso do pico 1 no espectro, este corresponde ao grupo carbonila (C=O), o pico 2 ao grupo metileno ($-CH_2-$), o pico 3 ao grupo metino (≡CH) e o pico 4 corresponde ao grupo metila ($-CH_3$).

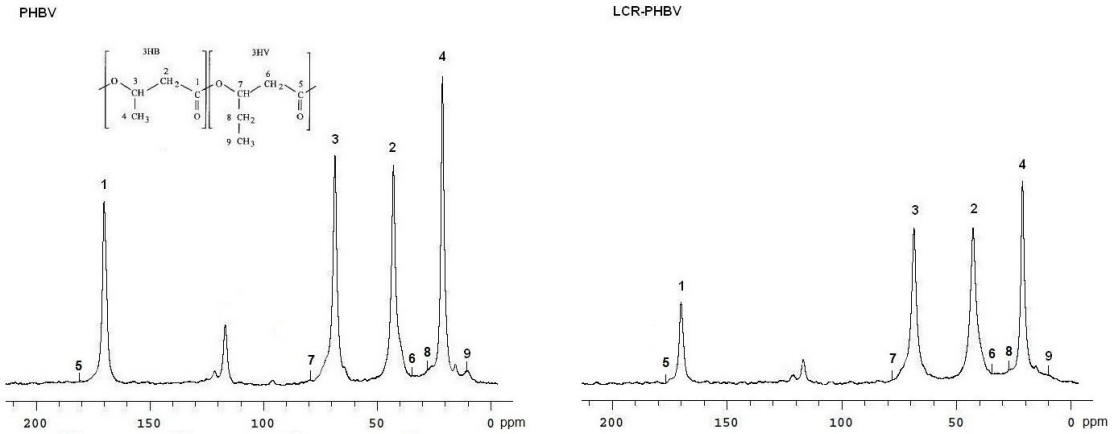

Figura 5. Espectros do RMN do ^{13}C em estado sólido do suporte (PHBV) e do biocatalisador imobilizado (LCR-PHBV) por meio da técnica CP-MAS

CONCLUSÕES

No presente estudo uma provável imobilização da lipase *Candida rugosa* (LCR) em biopolímero natural poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV foi verificado pelos resultados obtidos por análise em MEV e por avaliação físico-química (TGA, DSC, FTIR e RMN). A LCR imobilizada em PHBV mostra-se como um sistema bastante promissor a ser usado em diversas aplicações industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G. e Soldi, V. (2004), Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630.

Dandavate, V.; Keharia, H. e Madamwar, D. (2008), Ethy isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lípase immobilized on sílica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 349-352.

Gonçalves, S. P. C.; Martins-Franchetti, S. M. e Chinaglia, D. L. (2009), Biodegradation of the films of PP, PHBV and its blend in soil. *Journal Polymer Environmental*, v. 17, p. 280-285.

Guisan, J. M. (2006), Immobilization and enzymes e cell, 2 ed., Human Press Inc., New Jersey.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R. e Guisán, J. M. (2000), Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microbial Technology*, v. 26, p. 509-515.

Singh, S. e Mohanty, A. K. (2007), Wood fiber reinforced bacterial bioplastic composites: Fabrication and performance evaluation. *Composites Science Technology*, v. 67, p. 1753-1763.

Slater, S.; Mitsky, T. A.; Houmiel, K. L.; Hao, M.; Reiser, S. E.; Taylor, N. B.; Tran, M.; Valentin, H. E.; Rodriguez, D. J.; Stone, D. A.; Padgette, S. R.; Kishore, G. e Gruys, K. J. (1999). Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nature America Inc.*, v. 17, p. 1011-1016.

Soares, C. M. F.; Santos, O. A.; de Castro, H. F.; Moraes, F. F. e Zanin, G. M. (2004). Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 307-319.