

USO DE LÍQUIDOS IÔNICOS NA IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA DA LIPASE *CANDIDA RUGOSA*.

R. Y. CABRERA-PADILLA¹, J. M. M. PENHA¹, L. S. PRATA¹, A. T. FRICKS^{1,2}, E. FRANCESCHI^{1,2}, A. S. LIMA^{1,2}, D. P. SILVA^{1,2}, C. M. F. SOARES^{1,2}

¹Universidade Tiradentes, Programa de Pós-graduação de Engenharia de Processos

²Instituto de Tecnologia e Pesquisa,

E-mail para contato: yndiracp@yahoo.com

RESUMO – No presente trabalho foi estudado a influência da adição de diferentes líquidos iônicos (LIs) no processo de imobilização da lipase *Cândida rugosa* (LCR) em poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (PHBV) por adsorção física. Foram testados dois LIs hidrofóbicos e três LIs hidrofílicos como aditivos. Foram determinados a recuperação total da atividade dos derivados imobilizados e realizada a caracterização bioquímica do biocatalisador mais eficiente. Os resultados da recuperação total da actividade para os biocatalisadores imobilizados com a adição de LIs, foram superiores (68% e 78%) apenas para os biocatalisadores com LI hidrofóbico, enquanto que para os biocatalisadores com LIs hidrofílicos os valores foram similares a da enzima imobilizada na ausência de líquido iônico. Após a selecção do derivado imobilizado com maior rendimento de imobilização foi realizada a caracterização bioquímica, resultando principalmente em um considerável melhoramento da estabilidade operacional em comparação com o biocatalisador imobilizado na ausência de líquido iônico.

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios nas últimas décadas é o uso de conceitos relativos à estabilidade do biocatalisador imobilizado, como por exemplo o uso de aditivos na imobilização e/ou mudança dos processos para a obtenção do biocatalisador imobilizado. De acordo com a literatura, o uso de aditivos no processo de imobilização influencia positivamente no aumento da atividade e da estabilidade de enzimas (Zarcuła *et al.*, 2010). Dentre os principais aditivos utilizados na imobilização de enzimas, destacam-se a caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, álcool polivinílico, polietilenoglicol e, recentemente, o uso de líquidos iônicos (LIs). Os LIs são utilizados em diferentes técnicas de imobilização de enzimas com o intuito de contribuir positivamente na estabilidade operacional destes biocatalisadores imobilizados (Zarcuła *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2013). Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a influência do caráter hidrofóbico ou hidrofílico de líquidos iônicos na lipase *Cândida rugosa* imobilizada por adsorção física em bio-polímero poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) PHBV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica da LCR na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al.* (1999), com modificações.

2.2. Imobilização da Enzima em PHBV na presença de LIs

A enzima lipase *Candida rugosa* (LCR) foi imobilizada por adsorção física de acordo a metodologia descrita por Cabrera-Padilla *et al.* (2012) com modificação, que consistiu na adição de 1% (v/v) de líquido iônico. Foram utilizados os seguintes líquidos iônicos: bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-Etil-3-metilimidazólio ($C_{2min}[TF_2N]$); bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-butil-3- metilimidazólio ($C_{4min}[TF_2N]$); Diacimida de 1-butil-3- metilimidazólio ($C_{4min}[N(CN)_2]$); Cloreto de 1- butil-3- metilimidazólio ($C_{4min}[Cl]$); Cloreto de 1- butil-3- metilpiridínio ($C_4Pyr[Cl]$).

2.3. Caracterização Bioquímica do Biocatalisador Imobilizado

O biocatalisador imobilizado utilizando LIs como aditivos que obteve o melhor rendimento de imobilização foi caracterizado com respeito a:

Atividade em função do pH e da temperatura: Foi estudada utilizando-se azeite de oliva como substrato na faixa de pH entre 5,0 a 9,0. A influência da temperatura na atividade da LCR imobilizada foi determinada em pH 7,0 nas temperaturas de 30 a 70°C.

Estabilidade térmica: Foi determinado por meio da incubação do biocatalisador (0,1 g massa seca) a 37 e 60°C em meio-aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0) por 4 horas. Em tempos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas e imediatamente resfriadas. Em seguida, a atividade hidrolítica residual foi determinada a 37°C (10 min), como descrito anteriormente.

Estabilidade operacional em meio aquoso: Foi determinada em reações de hidrólise em bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (0,1 g). Foram realizadas bateladas de 10 min a 37°C e pH 7,0. A cada batelada o biocatalisador foi lavado com o hexano para remoção dos reagentes e produtos eventualmente retidos no suporte. Após 30 minutos, tempo necessário para a evaporação do solvente, o biocatalisador era reutilizada em outra reação com um novo substrato.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade Enzimática dos Biocatalisadores Imobilizados com LIs.

As maiores recuperações de atividade foram observadas para o biocatalisador imobilizado na presença de $C_{4min}[TF_2N]$ que foi obtido 78% e com o LI $C_{2min}[TF_2N]$ que foi obtido 68%. E os demais líquidos iônicos utilizados no processo de imobilização apresentaram recuperações de atividade similares ao biocatalisador imobilizado na ausência de líquido iônico (Figura 1). Os resultados positivos dos biocatalisadores ($C_{2min}[TF_2N]$ e $C_{4min}[TF_2N]$) foram atribuídos a anion hidrofóbico Ntf_2^- do líquido iônico que abriu os sítios ativos e promoveu a atividade da LCR segundo descrito por Hara *et al.* (2009).

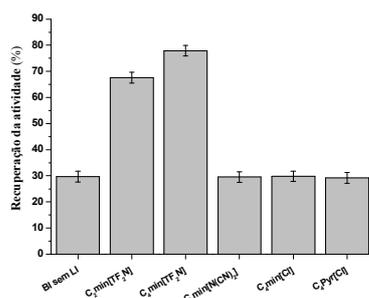


Figura 1 - Recuperação das atividades (%) para os biocatalisadores imobilizados sem e com Lis.

3.2. Efeito do pH e da Temperatura

Após a determinação do biocatalisador imobilizado na presença de $C_4min[TF_2N]$ como o mais eficiente, foi verificado o efeito do pH e da temperatura para este derivado imobilizado. Na Figura 2 pode-se observar o pH ótimo entre 7,0 - 7,5 para a enzima livre (LCR), o biocatalisador imobilizado na presença de $C_4min[TF_2N]$ (BI com LI) e do biocatalisador imobilizado na ausência do LI (BI sem LI). E ainda deve-se salientar um perfil com maior estabilidade ao pH para os biocatalisadores imobilizados na ausência e na presença de LI comparado com a enzima livre.

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima livre (LCR) e dos biocatalisadores imobilizados na presença ou ausência de $C_4min[TF_2N]$ são mostrados na Figura 3. A temperatura ótima foi de $37^\circ C$ para as enzimas livre e imobilizadas. Pode-se observar perfis semelhantes para ambos os biocatalisadores imobilizados (BI sem LI e BI com LI), no entanto BI com LI apresentou uma maior resistência ao aumento da temperatura na faixa estudada. Este perfil de resistência ao aumento da temperatura pode ser atribuído a ligação de hidrogênio e a interação eletrostática entre líquido iônico e enzima que gerou uma elevada barreira cinética para o desdobramento da enzima, deste modo, a estrutura rígida da enzima foi protegido de ser destruída (Zou *et al.*, 2010).

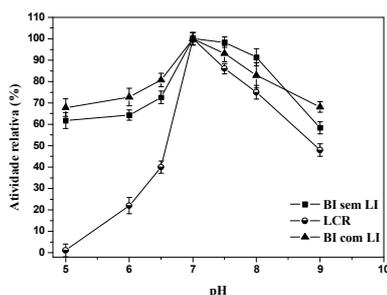


Figura 2 - Efeito do pH na atividade relativa da LCR livre e dos biocatalisadores imobilizados (BI sem LI) (BI Com LI).

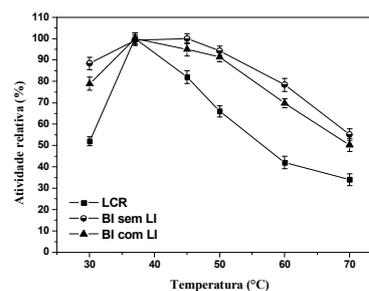


Figura 3 - Efeito da temperatura na atividade relativa da LCR livre e dos biocatalisadores imobilizados (BI sem LI) (BI Com LI).

3.3. Estabilidade térmica e operacional

A estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado na presença (BI com LI) e ausência (BI sem LI) foi determinada para as temperaturas de $37^\circ C$ e $60^\circ C$ (Figura 4). Na temperatura de $37^\circ C$ ambos os biocatalisadores imobilizados apresentaram um comportamento semelhante, enquanto que a $60^\circ C$ observou-se uma melhor estabilidade térmica para o BI com LI em comparação com o BI sem LI até 240 min. Portanto, pode-se afirmar o efeito positivo do uso de LI na imobilização por adsorção física da LCR referente a resistência a estabilidade térmica. Além da proteção devido a ligação de hidrogênio e a interação eletrostática entre líquido iônico e enzima relatado por Zou *et al.* (2010), deve-se considerar a estabilidade térmica do BI com LI devido ao caráter hidrofóbico $C_4min[TF_2N]$ que possibilita a formação de uma camada de hidratação ao redor da enzima favorecendo a atividade lipolítica e induzindo a água para mais próximo da enzima (Souza *et al.*, 2013).

Figura 5 mostra a variação da atividade relativa do biocatalisador imobilizado na presença de líquido iônico (BI com LI) após a reutilização. Observou-se que para o BI com LI após 33 ciclos de reutilização a atividade permaneceu maior que 50% da atividade inicial, cujos resultados são superiores aos 12 ciclos obtidos para LCR imobilizada em PHBV na ausência de líquido iônico (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012). Este resultado mostra que possivelmente a estrutura dos poros e as propriedades superficiais do suporte mudaram devido

à adição de LI, resultando no aumento da estabilidade operacional dos derivados imobilizados (Hara *et al.*, 2009).

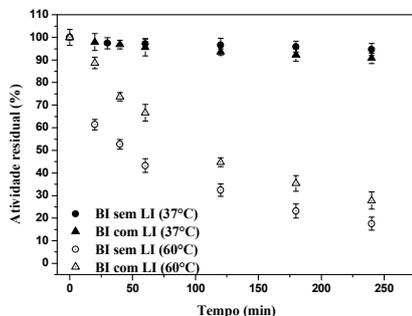


Figura 4 - Estabilidade térmica para os biocatalisadores imobilizados (BI sem LI) e (BI com LI).

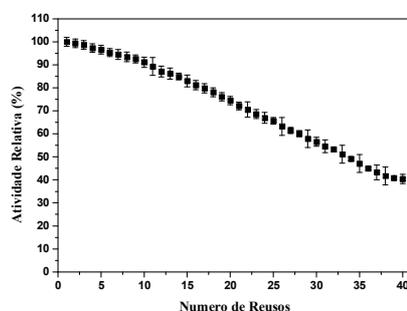


Figura 5 - Variação na atividade relativa, com o uso repetido do biocatalisador imobilizado (BI com LI).

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a imobilização da lipase *Candida rugosa* com adição de líquido iônico. Os melhores resultados foram obtidos para os LIs hidrofóbicos ($C_2\text{min}[\text{TF}_2\text{N}]$ e $C_4\text{min}[\text{TF}_2\text{N}]$) com uma recuperação total da atividade de 68% e 78%, respectivamente. Além disso, o BI com LI ($C_4\text{min}[\text{TF}_2\text{N}]$) apresentou uma considerável melhora na capacidade de reutilização comparado com o BI sem LI.

5. REFERÊNCIAS

- CABRERA-PADILLA, R.Y.; LISBOA, M.C.; FRICKS, A.T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A.S.; SILVA, D.P.; SOARES, C.M.F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, p. 289-298, 2012.
- HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, L.T. Immobilised *Burkholderia cepacia* lipase in dry organic solvents and ionic liquids: A comparison, *Green Chem.*, v. 11, p. 250–256, 2009.
- SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *App. Biochem. Biotechnol.*, v. 77-79, p. 745-758, 1999.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. P.; CONCEIÇÃO, T. G. C.; CARVALHO, N. B.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A.; FREITAS, L. S.; SILVA, S. M.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzym. Microbiol. Technol.*, v. 52, p. 141 -150, 2013
- ZARCULA, C.; CORÍCI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A, PETER, F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 65, p. 79–86, 2010.
- ZOU, B.; HU, Y.; YU, D.; XIA, J.; TANG, S.; LIU, W.; HUANG, H. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA15, *Biochem. Eng. J.*, v. 53 p. 150, 2010.