

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CAL B EM XEROGEL UTILIZANDO TMOS COMO PRECURSOR DA SÍLICA E PVA COMO ADITIVO

Immobilization of CAL B lipase in xerogel using TMOS as precursor of silica and PVA as additive

Angela Antunes¹; Aline Matuella Moreira Ficanha²; Leonardo Meirelles da Silva¹; Thais Comin¹,
Luciana Dornelles Venquiaruto¹; Marcelo Luis Mignoni¹, Jasan Dysarz Preczewski¹, Rogério Marcos
Dallago¹; Jamile Zeni¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos. URI Erechim - RS

² Centro de Ensino Riograndense, Departamento de Ciências Exatas e da Terra - Campus de Marau - RS
E-mail: nenaantunes@gmail.com

Data do recebimento: 13/03/2019 - Data do aceite: 07/06/2019

RESUMO: O principal objetivo da imobilização de enzimas é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas ao final de um processo, em comparação a sua forma livre, além de facilitar sua reutilização e, conseqüentemente, tornar-se um processo viável. Dentre as diferentes formas de imobilização, a técnica sol-gel destaca-se devido à possibilidade de imobilização *in situ*, controle da temperatura e pH na polimerização do suporte, além de permitir o uso de aditivos que atuam na proteção da enzima, aumentando a atividade e a estabilidade. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL B) e verificar, por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², qual o melhor percentual de aditivo álcool polivinílico (PVA) e a melhor concentração de enzima que codificam as maiores atividades da imobilização da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) em matriz hidrofóbica xerogel. A construção da superfície de resposta e curvas de contorno identificam como 0,411g de massa de aditivo e 1,22 mL de enzima, os melhores pontos do planejamento, cujos modelos foram estatisticamente validados, gerando um rendimento de imobilização de 601,34 %.

Palavras-chave: Biocatálise. Esterificação. Rendimento de Imobilização.

ABSTRACT: The main objective of enzyme immobilization is to obtain a biocatalyst with activity and stability that is not affected at the end of a process, compared to its free form, in addition to facilitating its reuse and consequently a feasible process. Among the different forms of immobilization, the sol-gel technique stands out due to the possibility of *in situ* immobilization, temperature control and pH in the polymerization of the support, besides allowing the use of additives that act in the protection of the enzyme, increasing the activity and stability. In this context, the objective of the present work was to immobilize the commercial lipase of *Candida antarctica* (CAL B) and to verify, through a Rotational Central Compound Design (DCCR) 2², the best percentage of polyvinyl alcohol additive (PVA) and the best enzyme concentration which encode the major activities of the lipase immobilization of *Candida antarctica* B (CAL B) in hydrophobic xerogel matrix. A construção da superfície de resposta e curvas de contorno identificam como 0,411g de massa de aditivo e 1,22 mL de enzima, os melhores pontos do planejamento, cujos modelos foram estatisticamente validados, gerando um rendimento de imobilização de 601,34 %. The construction of response surface and contour curves identified 0.411 mass additive and 1.22mL enzyme as the best planning points, whose models were statistically validated and yielding an immobilization yield of 601.34%.

Keywords: Biocatalysis. Esterification. Immobilization Yield.

Introdução

O uso de lipases como catalisadores de reações da indústria química é cada vez mais aplicado, devido a sua capacidade em modificar a velocidade de uma reação sem alterar o produto final (NADAR et al., 2018; SÓTI et al., 2018). Entretanto, as enzimas na sua forma livre possuem um curto tempo de vida, o que limita a sua utilização, as quais podem ser afetadas por diversos fatores como temperatura e pH, que podem causar desnaturação, perdendo seu poder catalítico e impedindo o seu reuso (URRITIA et al., 2018; HU et al., 2018).

As enzimas podem ser imobilizadas sobre uma ampla variedade de suportes naturais ou sintéticos, a seleção do suporte e/ou a técnica

depende da natureza da enzima, do substrato e da aplicação (BUGA et al., 2010).

O processo sol-gel é usado para a fabricação de vidro e materiais cerâmicos, em que a solução (sol) evolui gradualmente para a formação de um gel como rede que contém um líquido e de fase sólida (HENCH; WEST, 1990). Técnicas de sol-gel tornaram-se muito populares recentemente, devido à sua homogeneidade química elevada, temperaturas de processamento baixas, e a possibilidade de controlar o tamanho e a morfologia das partículas. Os materiais derivados de sol-gel proporcionam excelentes matrizes para uma variedade de compostos orgânicos e compostos inorgânicos. As vantagens da tecnologia de sol-gel são usadas nos campos de sensores biomédicos, materiais de *laser*, e para aplicações de entrega de drogas sustentadas (HENCH; WEST, 1990).

A imobilização da enzima no interior das matrizes produzidas pelo processo de sol-gel é uma técnica vantajosa, pois reserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

A secagem por evaporação normal da suspensão coloidal provoca o surgimento de uma pressão capilar, levando ao encolhimento da rede do gel. Isto resulta na formação do xerogel. Da própria palavra, “xero” significa secar, daí pode-se, de maneira simples, assumir que xerogel é simplesmente um gel que foi seco sob condições normais de temperatura e pressão (BRINKER; SCHERER, 1990).

A utilização de aditivos para estabilizar enzimas dentro da matriz sol-gel, como açúcares, aminoácidos, polióis e agentes tensoativos, tem sido feita para aumentar a atividade e estabilidade de várias enzimas imobilizadas por alteração da hidratação da enzima ou redução do encolhimento do gel. Eles também podem afetar as propriedades físicas do gel através da participação em reações de condensação com grupos silanol livres (REETZ et al., 2003; SOARES et al., 2006).

São exemplos de aditivos eficientes utilizados para imobilização de lipases nos suportes obtidos pela técnica sol-gel: o polietilenoglicol (PEG), líquidos iônicos (LIs), álcool polivinílico (PVA), caseína, gelatina e albumina (REETZ; ZONTA; SIMPEL-KAMP, 1996; VILLENEUVE et al., 2000; SOARES et al., 2003, 2004, 2005; HARA et al., 2010; BATTISTON, et. al., 2017).

A escolha do aditivo a ser utilizado no processo de imobilização está associada ao tipo de fenômeno no sistema imobilizado, tais como: proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de imobilização; retenção da camada de água ao redor do biocatalisador; efeitos dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa (SOARES et al., 2005; HARA et al., 2010).

O álcool polivinílico (PVA) apresenta boas características para aplicação na imobilização de enzimas, devido à sua grande área de superfície, alta porosidade, estabilidade térmica, óptica e química (LIMA-BARROS et al., 2002).

Neste contexto, para a imobilização da lipase *Candida antartctica* B, optou-se pelo emprego do método sol-gel, particularmente pela sua simplicidade, sendo que a enzima a ser imobilizada é adicionada *in situ* durante a formação da matriz, proporcionando a incorporação total da enzima oferecida ao suporte, além de o processo ocorrer em condições brandas de temperatura (ambiente) e em uma ampla região de pH. Como aditivo empregou-se o álcool polivinílico (PVA).

Metodologia

Enzima e materiais químicos utilizados

A lipase de *Candida antartctica* B (CAL B, Novozymes) foi imobilizada em sílica obtida pela técnica sol-gel. Os produtos químicos utilizados foram tetrametilortossilicato (TMOS, 99% Sigma-Aldrich) como precursor da sílica; etanolamina (98%, Sigma-Aldrich) como iniciador da reação de polimerização, brometo de cetiltrimetilamônio como agente direcionador da estrutura (CTMABr, 98% Sigma-Aldrich), polietilenoglicol 1500 (Sigma-Aldrich) e água destilada.

Influência da Porcentagem de Aditivo (PVA) e da Concentração de Enzima na Atividade de Esterificação do Imobilizado

O emprego do PVA como aditivo na imobilização de xerogel foi avaliado mediante o emprego de planejamento experimental DCCR 2². A outra variável avaliada foi o

volume de extrato enzimático. As variáveis e os valores codificados estudados encontram-se apresentados na Tabela I.

A resposta avaliada foi a atividade do derivado imobilizado produzido e o rendimento de imobilização.

A lipase de *Candida antarctica* B foi imobilizada *in situ* em uma matriz hidrofóbica obtida pelo método sol-gel. A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario et al. (2009). Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa com os volumes de extrato enzimático e massa de PVA. Água destilada foi adicionada para alcançar o volume total de 18 mL. Essa solução foi submetida por 1 h a agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente (25 °C), 300 rpm. Após este período, foram adicionados 3,69 mL de TMOS e 0,075 mL de Etanolamina. Então, a solução foi submetida novamente a agitação, em agitador orbital, a temperatura ambiente, 300 rpm, por um período de 24 h para completar a secagem do suporte.

Determinação do Rendimento de Imobilização

O rendimento do imobilizado foi calculado considerando a atividade total da enzima livre em solução ofertada ao sistema (a qual considera o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização e atividade da enzima livre (U/mL)) e a atividade

total presente no derivado imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido e atividade do derivado imobilizado (U/g)) de acordo com a Equação 1.

(1)

$$R (\%) = \frac{U_x}{U_0} \times 100$$

Onde: R (%): Rendimento do imobilizado; U_x : Atividade de esterificação total do derivado imobilizado; U_0 : Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

Determinação da Atividade de Esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada por meio da reação de síntese de oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar de 1:1 (mistura padrão), conforme descrito na literatura (FERRAZ et al., 2012). A reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada ou livre (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 min. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para inativar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi quantificada por titulação com NaOH 0,05 mol/L até o meio atingir pH 11 (ponto de equivalência do ácido

Tabela I - Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2² completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em xerogel com presença de PVA

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
Massa de Aditivo - PVA (g)	X ₁	0,02	0,114	0,342	0,57	0,66
Volume de extrato enzimático (mL)	X ₂	0,295	0,5	1	1,5	1,705

oleico). Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol.

Uma unidade de atividade enzimática (U/g) foi definida como a quantidade de ácido graxo consumido por minuto por g de enzima ou derivado imobilizado, calculada pela Equação 2:

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c} \quad (2)$$

Onde: AE: Atividade de esterificação (U/g); Va: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL); Vb: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL); M: Molaridade da solução de NaOH; Vf: Volume final de meio reacional (mL); t: Tempo (minutos); m: Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g); Vc: Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Avaliação da Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional ou reuso do biocatalisador imobilizado foi determinado seguindo método descrito por Ficanha et al. (2015). Este procedimento foi realizado utilizando o imobilizado obtido pelo ponto ótimo do Planejamento Experimental. Foram realizadas sucessivas reações iguais às descritas para o cálculo de atividade, sendo que ao final de cada uma o meio reacional foi removido, e nova adição de solução padrão realizada. Este processo foi repetido até a atividade residual do imobilizado chegar a 50% ou menos da atividade inicial.

Estabilidade de Armazenamento

Foram avaliadas duas faixas de temperatura de armazenamento para o derivado

imobilizado: i) temperatura ambiente (entre 10 e 30°C) e ii) baixas temperaturas (entre 2 e 5°C). Para a última empregou-se uma geladeira (Electrolux - Super Freezer DC9A).

Como resposta acompanhou-se a atividade para a síntese do oleato de etila. Os ensaios foram realizados periodicamente (no início, diariamente e, depois, semanalmente), sendo a estabilidade expressa em termos de atividade residual em relação à atividade do dia da síntese (tempo zero '0').

Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade residual (AR), calculada pela Equação 3.

$$AR (\%) = \frac{AE_i}{AE_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde: AE_i: atividade de esterificação no tempo "i", AE₀ da atividade de esterificação no tempo inicial.

Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da lipase CAL B livre e imobilizada foram determinadas pelo método de Arrhenius. A partir dos dados obtidos durante a avaliação da estabilidade térmica determinou-se a cinética de degradação de ambos por meio da análise da ordem de reação.

A estabilidade à temperatura foi realizada através da incubação das enzimas em temperaturas de 40, 60 e 80°C. Amostras foram retiradas ao longo do tempo de incubação para a realização da atividade de esterificação e determinação da atividade residual (AR). A atividade residual (AR) foi calculada por meio da razão da atividade de esterificação no tempo "i" pela atividade de esterificação inicial.

A constante de desativação térmica (K_d) em cada temperatura foi calculada segundo o

modelo cinético de Arrhenius, considerando-se que a inativação das enzimas segue a cinética de primeira ordem, conforme Equação 4.

(4)

$$A = A_0 \exp. (-k_d \cdot t)$$

A partir das constantes de desativação térmica em cada temperatura, foram obtidos os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) (Equação 5), que corresponde ao tempo necessário para que ocorra a inativação de 50 % da concentração enzimática inicial, na temperatura testada.

(5)

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k_d}$$

Onde: A_0 : atividade inicial; A: atividade final; t: tempo; $t_{1/2}$: tempo de meia-vida; K_d : constante de desativação.

Análise Estatística

Os resultados para atividade de esterificação obtidos no planejamento foram analisados através de Análise de Variância e Metodologia de Superfície de Resposta utilizando-se o módulo Experimental Design do Software Statistica 5.0.

Caracterização dos Imobilizados

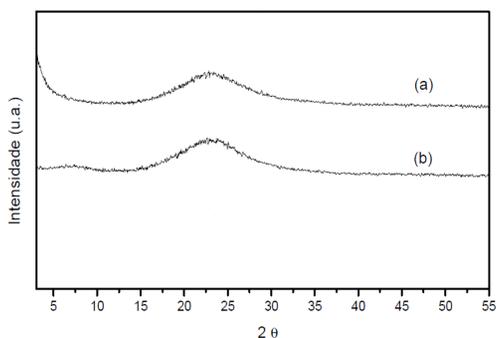
Os suportes foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku, Miniflex II, Ka- 1,58 Cu).

Resultados e Discussões

Difração de raios X (DRX)

A Figura 1 apresenta os difratogramas de raios X para os xerogéis obtidos pela técnica de sol-gel empregando PVA como aditivo, na (a) presença e (b) na ausência de enzima.

Figura 1 - Difratogramas de raios X dos xerogéis sintetizados empregando como aditivo PVA: (a) contendo a enzima lipase e (b) sem enzima



De acordo com a Figura 2, ambos os xerogéis obtidos apresentam uma mesma estruturação. Apresentaram um halo na região compreendida entre 15 – 30 o (2θ), os quais são característicos de materiais sem ordenação cristalina, ou seja, de materiais amorfos.

A estrutura amorfa do derivado foi descrita por Hench et al. (1992), os quais relatam que as reações de hidrólise e condensação do monômero de silício em presença de um catalisador ácido ou básico atuam como agente de ligação cruzada com a formação da estrutura amorfa SiO_2 , na qual o reticulado tridimensional é formado ao redor da enzima.

Influência da Porcentagem de Aditivo e da Concentração de Enzima na Atividade de Esterificação do Imobilizado

A síntese do derivado imobilizado em xerogel com PVA foi conduzida empregando um DCCR 2^2 para avaliar os efeitos das variáveis sobre o processo de imobilização. As variáveis, massa de aditivo e volume de extrato de enzima, foram estudadas a fim de se obter a máxima atividade de esterificação. Os níveis, com seus respectivos valores e os resultados de atividade para cada experimento realizado, encontram-se apresentados na Tabela II.

Tabela II - DCCR 2² em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado em xerogel

Experimento	X ₁ (g)	X ₂ (mL)	Atividade AE ± DPad
1	-1 (0,114)	-1 (0,5)	167,86 ± 30,99
2	+1 (0,57)	-1 (0,5)	295,99 ± 30,81
3	-1 (0,114)	+1 (1,5)	314,10 ± 13,60
4	+1 (0,57)	+1 (1,5)	585,55 ± 11,63
5	-1,41 (0,02)	0 (1)	457,87 ± 32,50
6	+1,41 (0,66)	0 (1)	536,44 ± 30,22
7	0 (0,342)	-1,41 (0,295)	188,82 ± 31,22
8	0 (0,342)	+1,41 (1,705)	646,98 ± 33,55
9	0 (0,342)	0 (1)	699,54 ± 18,65
10	0 (0,342)	0 (1)	694,36 ± 18,08
11	0 (0,342)	0 (1)	695,36 ± 11,59

X₁: Massa de aditivo; X₂: volume de extrato enzimático

Como para os derivados imobilizados com PEG, os derivados imobilizados com PVA apresentaram, quando analisados de forma independente, um efeito positivo para as variáveis estudadas, com os ensaios conduzidos com os níveis superiores (+1) apresentando maiores atividades em relação aos conduzidos com os níveis inferiores (-1). Para ilustrar, podemos citar o aumento de atividade de aproximadamente 200 % observado entre os ensaios 1 (167 U/g), empregando os níveis inferiores (-1) e 6 (536 U/g), empregando os níveis superiores (+1).

Também podemos perceber que, quando aumentamos a massa de aditivo, mantendo constante o volume de extrato enzimático (ensaios 1 e 2, 3 e 4), as atividades de esterificação seguem uma tendência crescente para este aumento. O mesmo comportamento

pode ser observado para o volume de extrato enzimático (ensaios 1 e 3, 2 e 4), cujo aumento proporciona um aumento de atividade de esterificação.

No entanto, as maiores atividades \cong 695 U/g foram verificadas no ponto central, o qual foi sintetizado nas condições intermediárias, sugerindo a otimização do processo de imobilização de xerogel com PVA.

Os dados experimentais obtidos do DCCR foram analisados por análise de variância; o coeficiente de regressão e erro padrão, e valores de t e p para a atividade de esterificação foram analisados com nível de confiança de 95 %.

Todos os fatores avaliados foram estatisticamente validados ($p \leq 0,05$) no que se refere à atividade de esterificação dos imobilizados. Observa-se que as duas variáveis

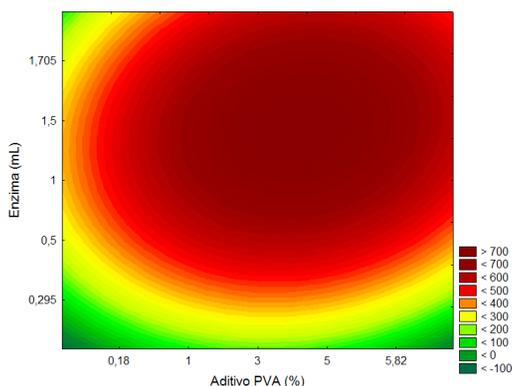
têm efeito positivo sobre essa, o que indica que aumento na massa de aditivo e no volume de extrato enzimático afetarão positivamente a atividade.

A análise de variância demonstra que se obteve um coeficiente de regressão de 0,95 e F calculado maior que F tabelado, permitindo, dessa forma, a construção do modelo matemático (Equação 6) curvas de contorno (Figura 2) para variáveis porcentagem de aditivo e concentração de enzima.

(6)

$$AE = 476,59 + 129,92x_1 - 92,04x_1^2 + 30,68x_2 - 127,01x_2^2 - 25,00x_1x_2$$

Figura 2 - Curva de contorno para a atividade de esterificação em função das variáveis massa de aditivo (PVA) e volume de extrato enzimático



A Figura 2 representa a atividade de esterificação em função das variáveis estudadas no planejamento experimental, e pode-se observar que esta tende a valores ótimos em valores próximos ao ponto central do planejamento.

A massa de aditivo (X_1) e o volume de extrato enzimático (X_2) para máxima atividade de esterificação foram calculados por meio da solução de um sistema linear de ordem 2 x 2. Este sistema foi obtido pelas derivadas parciais do modelo em relação às duas variáveis e igualadas a zero.

As atividades de esterificação máximas da lipase imobilizada foram obtidas nos níveis codificados 0,3069 e 0,4335 para massa de aditivo (X_1) e o volume de extrato enzimático (X_2), respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores de 0,411 g de aditivo PVA e 1,22 mL de extrato enzimático.

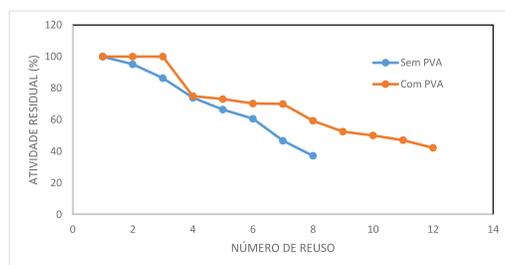
Nova imobilização enzimática foi realizada utilizando os valores obtidos como ótimos no planejamento e a atividade de esterificação deste derivado imobilizado encontrada experimentalmente (690,1 U/g) foi similar ao valor teórico do modelo, validando-o, correspondendo a um rendimento de imobilização de 601,34 %.

Avaliação da Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional do xerogel imobilizado com PVA foi verificada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com a reutilização do imobilizado.

A Figura 3 apresenta a atividade residual e o número de ciclos realizados com o suporte xerogel na presença e ausência do aditivo PVA, nas condições ótimas do planejamento experimental (0,411g de massa do aditivo e 1,22 mL de concentração de enzima).

Figura 3 - Reuso da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA



Observa-se na Figura 3 que o número de ciclos obtidos, considerando 50% da ativi-

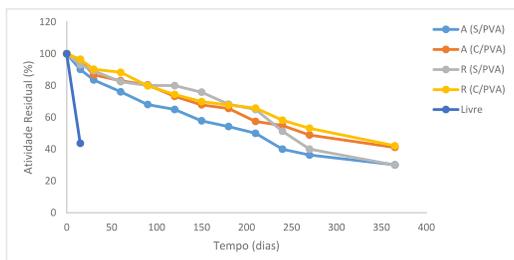
dade inicial, chegou a 10 para o imobilizado com a presença do aditivo PVA. Já para o imobilizado sem a presença do aditivo, o número de ciclos com atividade residual proposta foi de 6.

O uso de suportes macroporosos para imobilização de enzimas é pouco relatado na literatura e relacionado com a possibilidade de lixiviação da enzima do poro do suporte durante a utilização do biocatalisador imobilizado. Portanto, sugere-se o uso de suportes micro ou mesoporosos (ISPAS et al. 2009; GERARDIN et al. 2013). A diferença observada entre os derivados sugere que a presença do aditivo atue minimizando esta perda por lixiviação.

Avaliação da Estabilidade de Armazenamento

A Figura 4 apresenta os resultados da estabilidade de armazenamento do derivado imobilizado em xerogel na presença e ausência do aditivo PVA.

Figura 4 - Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA, em temperatura ambiente e refrigerador



A: temperatura ambiente; R: temperatura de refrigerador

A: temperatura ambiente; R: temperatura de refrigerador

Em relação aos derivados imobilizados, todos apresentaram uma mesma tendência, com uma queda contínua na atividade residual durante o período de armazenamento, apre-

sentando atividade residual superior a 50% após 220 dias de armazenamento. Atividade essa – em termos de desempenho de estabilidade – superior à observada para a enzima livre, a qual apresentou atividade residual inferior a 40% com 20 dias de armazenamento, indicando um efeito benéfico da imobilização em relação à enzima livre no que se refere à estabilidade ao armazenamento.

Em relação às condições de armazenamento, os imobilizados armazenados em refrigeração apresentaram melhor desempenho em relação aos armazenados a temperatura ambiente (25 °C). A presença do PVA também se demonstrou positiva, com os derivados sintetizadas na presença de PVA apresentando melhor desempenho que os sintetizados na ausência do respectivo aditivo. Os resultados corroboram com a literatura no que se refere ao emprego do PVA como suporte enzimático, seja na forma de esferas (Moore et al. 2007), partículas (Matsuda et al. 2009) ou fibras (SHINDE et al. 2018).

Shinde et al. (2018) imobilizaram desidrogenase alcoólica em fibras de álcool polivinílico funcionalizado. A imobilização proporcionou alteração do pH da reação ótima de 7 para 9, melhorou a termoestabilidade a 60 °C, além de reter 60% de sua atividade original após oito ciclos de reutilização.

Avaliação da Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica foi avaliada por meio do cálculo da constante de desativação térmica (K_d) e do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em xerogel com e sem a presença de PVA utilizado como aditivo (Tabela III).

Para o aditivo PVA, os valores de desativação térmica e tempo de meia-vida indicam um efeito negativo do aditivo em relação à estabilidade térmica, com o derivado imobilizado com PVA apresentando valores de K_d

Tabela III - Constante de desativação térmica (K_d), os coeficientes de determinação (R^2) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB livre e imobilizada em xerogel com e sem PVA

Temperatura (°C)	Enzima Livre			Xerogel (sem PVA)			Xerogel (com PVA)		
	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)
40	0,12	0,89	5,79	0,0819	0,91	8,46	0,27	0,85	2,54
60	0,42	0,89	1,66	0,2180	0,90	3,18	0,66	0,89	1,03
80	1,48	0,99	0,47	0,6307	0,93	1,10	2,66	0,91	0,26

superiores, o que corresponde a tempos de meia-vida inferiores, inclusive em relação à enzima livre (Tabela III).

Por exemplo, o valor de K_d obtido a temperatura de 80 °C para o derivado imobilizado com PVA correspondente a 2,66 h⁻¹, este valor é 4,2 vezes superior ao encontrado para o derivado imobilizado sem PVA ($K_d = 0,63$ h⁻¹), e 1,8 vezes superior quando comparado com a enzima livre ($K_d = 1,48$ h⁻¹). Essa mesma tendência foi observada nas outras temperaturas avaliadas.

Resultados distintos foram observados por Ficanha (2017), a qual demonstrou um efeito positivo do aditivo PEG empregado no processo de imobilização de lipase em xerogel. A presença do PEG aumenta o tempo de meia-vida e reduz o valor da K_d , indicando um efeito positivo do PEG sobre a estabilidade térmica da enzima.

As tendências opostas observadas entre os aditivos demonstram a importância do referido estudo no que se refere ao emprego de aditivos em processos de imobilização.

Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) de um biocatalisador correspondem a valores numericamente iguais ao tempo necessário para atingir uma diminuição de 50% da sua atividade enzimática inicial, respectivamente. A lipase imobilizada sem adição de PVA mostrou-se mais estável à desativação térmica que as formas livres, obtendo-se tempos de $t_{1/2}$ na faixa de 8,46 a 1,1 h. Esta diferença em

termos de funcionalidade, aliada à temperatura, pode, de certa forma, estar interferindo de maneira negativa sobre a estabilidade da enzima, conduzindo à perda de atividade da mesma e, conseqüentemente, potencializando a inativação térmica da mesma em relação à enzima livre e ao derivado imobilizado sintetizado sem o PVA.

O efeito da temperatura na solubilidade está vinculado à quebra das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Assim, ao se aumentar a temperatura, pode ocorrer a quebra das pontes de hidrogênio com a água, levando a uma diminuição na solubilidade. Após a dissolução, o PVA se mantém estável em solução aquosa, mesmo em temperatura ambiente (WU et al. 2002), sendo assim a condução de calor devido à solubilidade do meio reacional faz com que o PVA esteja auxiliando na transferência de calor e, por conseqüência, na desativação térmica.

Conclusões

A utilização de um planejamento experimental, como o DCCR, provou ser uma ferramenta importante para otimizar o processo de imobilização pela técnica sol-gel com o uso de PVA como aditivo para maximizar a atividade do suporte imobilizado.

Quando se fez o estudo do xerogel com o uso do aditivo PVA, este apresentou um desempenho relevante na AE quando se estudou a estabilidade operacional (10 ciclos) e de

armazenamento (365 dias com quase todos os imobilizados com 50% de atividade residual).

Tratando-se de um estudo pioneiro, o comportamento do xerogel com o uso do

PVA mostrou-se eficiente, sendo possível observar que o estudo tem relevância frente às diferentes possibilidades de utilização nos mais diversos setores industriais.

AGRADECIMENTOS

URI, CNPq, FAPERGS e CAPES (Brazilian Agency for Improvement of Graduate Personnel - Finance Code 001)

REFERÊNCIAS

- ALFAYA, A.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- BATTISTON, C. S. Z.; FICANHA, A. M. M.; LEVANDOSKI, K. L. D.; SILVA, B. A.; BATTISTON, S.; DALLAGO, R. M. AND MIGNONI, M. L., Immobilization of lipase on mesoporous molecular sieve MCM-48 obtained using ionic solid as a structure director and esterification reaction on solvent-free. **Química Nova**, v. 40, n 3, 293-298, 2017.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**. Academic Press. Inc.: San Diego, 1990.
- BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8934-8943, 2010.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FICANHA, A. M. M., NYARI, N. L. D., LEVANDOSKI, K., MIGNONI, L. M., DALLAGO, M. R. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, n.3, p. 364-369, 2015.
- FICANHA, M. M. A. **Imobilização da lipase *Candida antarctica* B (Cal B) em sílica xerogel e aerogel obtidos pela técnica sol-gel na presença dos aditivos polietilenoglicol e líquidos iônicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Erechim, 2017.
- GERARDIN, C.; REBOUL, J; BONNE, M.; LEBEAU, B. Ecodesign of ordered mesoporous silica materials. **Chemical. Society. Reviews**, v. 42, n. 9, p. 4217-55, 2013.

- HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. "Supported ionic liquids in Burkholderia cepacia lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, vol. 67, p. 129-134, 2010.
- HENCH, L.L.; WEST, J.K. The sol-gel process. **Chemistry Revive**, v. 90, n. 1, p. 33-72, 1990.
- HU, Y.; DAI, L.; DU, W.; WANG, Y. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 793-801, 2018.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 543-54, 2009.
- LIMA-BARROS, A.E. et al. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 4, p. 459-463, 2002.
- MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.118, n.1, p. 334-340, 2009.
- MATSUDA T., YAMANAKA R., NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p. 513-557, 2009.
- MOORE, J. C. . POLLARD, D. J., KOSJEK, B., DEVINE, P. N. Advances in the enzymatic reduction of ketones, **Accounts of Chemical research**, v. 40, n. 12, p. 1412-1419, 2007.
- NADAR, S. S.; RAO, P.; RATHOD, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, n. 108, p. 309-330, 2018.
- REETZ, M. T.; TIELMANN, P.; WISENHOFER, W.; KONEN, W.; ZONTA, A. Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. **Advanced Synthesis e Catalysis**, v. 345, n. 6-7, p. 717-728, 2003.
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n.5, p. 527-534, 1996.
- SHINDE, P. ., MUSAMEH, M., GAO, Y. ., ROBINSON, A. J., KYRATZIS, I. L. Immobilization and stabilization of alcohol dehydrogenase on polyvinyl alcohol fibre, **Biotechnology Reports**, v. 19, p. 4-7, 2018.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. **Applied Biochemistry and. Biotechnology**, v. 113, p.307-319, 2004.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p.69-76, 2006.
- SÓTI, V.; LENAERTS, S.; CORNET, I. Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, n. 270, p. 70-76, 2018.
- SOUZA, R. L. **Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases**. 2012, 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, 2012.

URRITIA, P.; BERNAL, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis.

International Journal of Biological Macromolecules, n. 116, p. 182-193, 2018.

WU, C.L., ZHANG, M.Q., RONG, M.Z., FRIEDRICH, K. Tensile Performance Improvement of Low Nanoparticles Filled-polypropylene Composites, **Composite Science and Technology**, v. 62, p. 1327-1340, 2002.

