



## Produção de imobilizado híbrido PÓS-PVA usando lipase de *Burkholderia cepacia*.

Jaqueline C. Duarte\*, Telma T. Franco, Giovana S. Padilha.

### Resumo

O projeto consistiu na caracterização da enzima de *Burkholderia cepacia*, definindo a temperatura e pH ótimos de trabalho, através do acompanhamento da atividade enzimática em diferentes condições de substrato ao longo do tempo, e na comparação dos resultados obtidos para a enzima livre, para a enzima imobilizada por adsorção física e por ligação covalente.

### Palavras-chave:

Lipase, imobilização, caracterização de enzimas.

### Introdução

As lipases são enzimas que atuam sobre ligações éster, sobretudo em substratos acilgliceróis, são utilizadas em diversas áreas, como alimentícia e farmacêutica, e podem ser obtidas naturalmente ou industrialmente. Como elas possuem alta sensibilidade a fatores químicos e físicos<sup>1</sup>, como alteração do pH, temperatura e interações com o substrato, é essencial que suas melhores condições de trabalho sejam conhecidas, assim como que ela sofra o processo de imobilização<sup>2</sup> para se proteger do solvente.

O processo de imobilização pode ocorrer por adsorção física (AF)<sup>3</sup>, onde não há modificações estruturais na enzima, mas ela ainda sofre dessorção por variações nas condições do sistema e depende da porosidade e área superficial do suporte. Já o processo por ligação covalente (LC)<sup>4</sup> possui maior rigidez quanto a variações de pH e temperatura e dificuldade de dessorção, mas pode afetar a atividade enzimática pelas modificações na estrutura terciária da enzima.

Os objetivos do projeto são, dessa forma, estabelecer os melhores pHs e temperaturas de trabalho para a enzima livre e para a enzima imobilizada, tanto por adsorção física quanto por ligação covalente.

### Resultados e Discussão

#### - Análise de pH para os 3 tipos de enzima:

A lipase em contato com o substrato de azeite de oliva (em goma arábica em tampão do pH) foi agitada por 15 minutos. Solução de acetona e álcool, para a titulação com KOH em fenoltaleína foi adicionada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade enzimática em diferentes pHs para enzima livre, imobilizada por AF e por LC.

Enzima	pH ótimo	Atividade (U/mg)
Livre	8	467,94
Imob. AF	8	1446,06
Imob. LC	9	1556,26

#### - Análise de temperatura para os 3 tipos de enzima:

A enzima foi colocada em agitação por 15 minutos com o substrato nos pHs definidos como ótimos previamente, a 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C. A mistura foi titulada com KOH (tabela 2).

**Tabela 2.** Temperatura de maior atividade enzimática para cada tipo de enzima.

Enzima	Temperatura ótima	Atividade (U/mg)
Livre	37°C	464,70
Imob. AF	40°C	1428,19
Imob. LC	45°C	1540,94

Observando os valores obtidos de temperatura e pH para cada enzima, foi possível perceber que a imobilização realmente permite que a lipase mantenha sua atividade enzimática alta em diversas condições de operação e que a imobilização por ligação covalente também atrasa as melhores temperaturas e pH para valores mais altos, ou seja, aumentando o período antes da desativação da enzima, como o esperado.

#### - Análise da estabilidade da enzima:

Para esta análise, a enzima era colocada em agitação com substrato e tampão, para 3 valores de pH, e sua atividade era medida por titulação a cada 30 minutos, totalizando 8 horas. Para a enzima imobilizada por adsorção física foi encontrada uma tendência em que a atividade crescia até 200 minutos, onde depois estabilizava. Foi possível concluir que as enzimas imobilizadas possuem atividade média maior que a enzima livre, comprovando a eficácia da imobilização.

### Conclusões

O projeto conseguiu comprovar os benefícios da imobilização de enzimas, em termos de aumento de atividade enzimática, ou seja, esse processo realmente consegue blindar a lipase frente a interações com o solvente. As condições ótimas de trabalho aumentam para o caso da imobilização por ligação covalente, mas, mesmo assim, esse tipo de enzima ainda possui bom comportamento nas condições de trabalho das enzimas livre e imobilizada por adsorção física. A análise de estabilidade foi melhor concluída no caso da enzima por adsorção física, mostrando que, após certo tempo, não há mais modificação na atividade enzimática.

<sup>1</sup> INANOV, A.E.; SCHNEIDER, M.P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, p. 303-309, 1997.

<sup>2</sup> DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n. 4, p. 623-630, 2004.

<sup>3</sup> CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 9, n. 36, p.48-57, 2006.

<sup>4</sup> YAMATO, S.; KAWAKAMI, N.; SHIMADA, K.; ONO, M.; IDEI, N.; ITOH, Y.; *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 191.