



INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO E DA LIGNINA NA MATRIZ DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Eversa TRANSFORM 2.0

Palavras-Chave: BIOCATALISADORES, LIPASE, LÍQUIDO IÔNICO

Autores/as:

REBECA LUANA CARNEIRO – FEA, UNICAMP

NICOLE MARASCA – LEMEB/DETA/FEA, UNICAMP

Prof. Dr. MARCUS BRUNO SOARES FORTE – LEMEB/DETA/FEA, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Diante das condições ambientais globais cada vez mais degradantes, é extremamente desejável avanços em reações de síntese orgânica, como a substituição de catalisadores químicos pelos bioquímicos (no caso, as enzimas), que conferem maior eficiência e seletividade, e podem atuar na síntese de medicamentos, compostos da química fina e biocombustíveis, como o biodiesel (Bell et al., 2021). As enzimas também são importantes na indústria alimentícia em processos como a produção de ésteres de aroma e sabor, produzindo compostos de maior pureza e rendimento (Garlapati; Banerjee, 2013).

A lipase possui grande versatilidade e pode atuar em reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, entre outras. A lipase Eversa® Transform 2.0 possui a vantagem de ser de baixo custo e apresentar boa atividade catalítica, em comparação com outras lipases comerciais (Almeida et al., 2021). A imobilização da enzima possui as vantagens de aumentar a atividade enzimática, a estabilidade, e também permitir a sua reutilização (Ismail; Baek, 2020). A técnica de encapsulamento é simples e eficiente, e torna possível a incorporação de aditivos ao material de suporte, para melhorar propriedades específicas. Alguns líquidos iônicos (Lis) podem aumentar a atividade e estabilidade de enzimas, enquanto que a lignina (lig) pode aumentar a atividade, resistência mecânica e estabilidade térmica (Badgujar et al., 2022; Park et al., 2015).

Tendo em vista a importância de novos estudos sobre processos ecologicamente corretos e a escassez de pesquisas envolvendo líquido iônico e lignina em conjunto e seus efeitos na atividade, estabilidade e influência na matriz de imobilização, o projeto se propõe a investigar o efeito da imobilização por encapsulação em alginato de cálcio acompanhada de três diferentes matrizes nessa formulação: LI + lig. e licor (contendo ambas as frações) resultante do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar, sobre a atividade catalítica e estabilidade da Eversa® Transform 2.0. Além disso as partículas produzidas em suas diferentes formulações serão avaliadas quanto a sua estabilidade térmica, bem como caracterizadas por meio de análise de resistência mecânica, termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaio de área superficial (SBET), e picnometria de gás hélio (He).

METODOLOGIA:

A pesquisa foi majoritariamente conduzida no Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos – LEMEB do Departamento de Engenharia de Alimentos/Faculdade de Engenharia de Alimentos/Universidade Estadual de Campinas. Algumas análises foram realizadas em laboratórios parceiros da universidade.

• Imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0

A produção das partículas contendo lipase foi realizada com as soluções de alginato de sódio (concentração de 2% m/m) e lipase Eversa® Transform 2.0 (10% m/m), com os aditivos: LI ([Mea][Ac]) + Lig. (Sigma Aldrich) e licor resultante de pré-tratamento da palha da cana-de-açúcar rico em LI e lig. (filtrado em papel filtro). As proporções estão detalhadas na Tabela 1. Após o processo de produção, as esferas foram divididas em duas frações. Uma das frações de esferas, o sobrenadante (solução residual) e a água de lavagem foram armazenados sob refrigeração a 5 °C. A outra fração de esferas foi liofilizada (Enterprise, Terroni, São Paulo, Brasil) por 48 horas e armazenada em um dessecador, resultando nos derivados imobilizados.

Tabela 1. Formulação das partículas selecionadas.

Partículas	Concentração de aditivos
P1	Controle sem aditivos
P2	0,5% LI + 0,05% Lig. (comercial)
PL2	0,5% LI + 0,05% Lig. (licor)

- **Determinação do teor de proteína**

No processo de imobilização foi contabilizado as proteínas sobrenadantes através do método Bradford (Bradford, 1976), com a utilização da curva padrão de albumina bovina. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 595 nm, para obter as concentrações proteicas.

- **Determinação da atividade enzimática**

A atividade enzimática da lipase (AE) foi medida através da hidrólise do palmitato de p-nitrofenil (pNPP) em p-nitrofenil (p-NP) (Almeida et al., 2023), em espectrofotômetro (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 410 nm. O rendimento de imobilização e a atividade recuperada do processo foram calculados de acordo com as equações (1) e (2):

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \left(\frac{AE_{\text{livre}} - AE_{\text{sobrenadante}}}{AE_{\text{livre}}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \left(\frac{AE_{\text{suporte}}}{AE_{\text{livre}} - AE_{\text{sobrenadante}}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

- **Efeito da temperatura na estabilidade da lipase**

Amostras contendo as partículas submersas em solução tampão fosfato (0,1M a pH 7) foram incubadas nas temperaturas de 60 e 70 °C em banho seco (DB-HCS – Loccus). A atividade enzimática foi determinada em intervalos de tempo de 15 minutos até a perda de 50% da atividade enzimática inicial. A constante de inativação térmica (Kd) foi calculada a partir da inclinação da curva do gráfico semilogarítmico da razão entre a atividade residual e a atividade inicial em função do tempo. O tempo de meia-vida (t1/2, tempo para a enzima diminuir sua atividade pela metade) e o tempo de redução decimal (valor D) foram determinados pelas equações 3 e 4, respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{\ln^{0,5}}{Kd} \quad (3) \quad D = \frac{\ln 10}{Kd} \quad (4)$$

Caracterização das partículas

- **Resistência mecânica**

A resistência das esferas úmidas à compressão foi determinada utilizando um analisador de textura TA.XTplus (Extralab, Brasil). Em resumo, uma força foi aplicada às esferas e sua resistência à deformação de 50% foi medida.

- **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia superficial das esferas liofilizadas carregadas e descarregadas foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura equipado com um detector de raios X por dispersão de energia (Quattro S, Thermo Fisher Scientific, República Tcheca), operando a 15 kV e 62 pA.

- **Análise Termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando um calorímetro Shimadzu TGA-50 (Japão) em atmosfera de nitrogênio, com vazão de 50 mL min⁻¹, rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e faixa de temperatura de 27 a 800 °C.

- **Área de Superfície Específica (SBET)**

A área superficial específica das esferas liofilizadas foi medida por adsorção de N₂ (Anton Paar, Quantachrome NOVA 1200e, Alemanha) a 77 K e calculada utilizando o método BET.

- **Picnometria de gás hélio**

A picnometria a gás hélio foi utilizada para determinar a densidade real das esferas, usando um aparelho (Micromeritics Instrument Corporation, AccuPyc II 1340, Norcross, Geórgia, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ao analisar a Tabela 2, infere-se que as partículas apresentam rendimento de imobilização e atividade recuperada semelhantes. A atividade recuperada relativamente baixa verificada pode ser atribuída a problemas de difusão causados pela matriz polimérica (Liu e Shi, 2024). No entanto, sabe-se que a imobilização oferece diversas vantagens, particularmente no que diz respeito à estabilidade enzimática, conforme observado em diversos estudos. Verificou-se ainda, que a partícula contendo o licor (PL2) apresentou leve acréscimo da atividade hidrolítica se comparado às demais formulações.

Tabela 2. Resultados das determinações de atividade enzimática e respectivos rendimentos e atividade recuperada das imobilizações para cada formulação de partículas.

Amostras	Atividade enzimática (U/g de proteína)	Rendimento da Imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
P1	924,62 ± 31,56	79,95 ± 1,37	21,39 ± 1,4
P2	956,18 ± 68,7	74,73 ± 4,38	26,78 ± 4,58
PL2	1152,99 ± 16,09	76,84 ± 0,32	24,37 ± 0,33

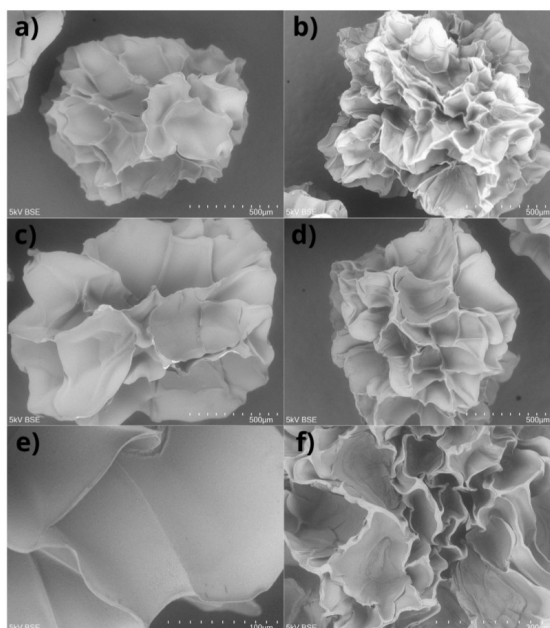
As partículas úmidas foram avaliadas quanto à resistência mecânica (tabela 3), dado o papel crítico deste parâmetro, especialmente em bioprocessos que requerem agitação intensa. As partículas produzidas com licor (PL2) apresentaram resistência mecânica mais elevada em comparação aos demais. Isso pode estar relacionado ao estágio de despolimerização da lignina ou outro componente estrutural remanescente no licor.

Tabela 3. Resistência mecânica das partículas.

Partículas	Resistência mecânica (N)
P1	5,98 ± 0,11
P2	5,50 ± 0,25
PL2	7,98 ± 0,73

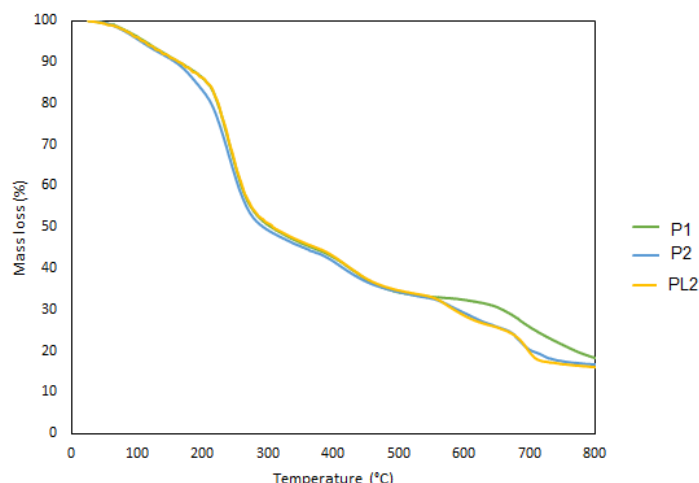
A análise da superfície das partículas verificadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 1) revelou que as partículas sem enzima (à esquerda) apresentam um aspecto mais liso, com menor incidência de poros e rachaduras, enquanto que as partículas contendo a lipase imobilizada (à direita) apresentam possuir uma superfície mais áspera e quebradiça, como também observado no estudo de Almeida et al. (2023). De uma forma geral, as cápsulas apresentam uma estrutura superficial colapsada e heterogênea, com numerosas microcavidades, resultado do processo de liofilização.

Figura 1. Análise das superfícies das partículas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na qual a) e b) são as partículas de controle, sem e com enzima; c) e d) são as partículas com líquido iônico e lignina comercial, sem e com enzima; e) e f) são as partículas com líquido iônico e lignina de pré-tratamento, sem e com enzima, respectivamente.



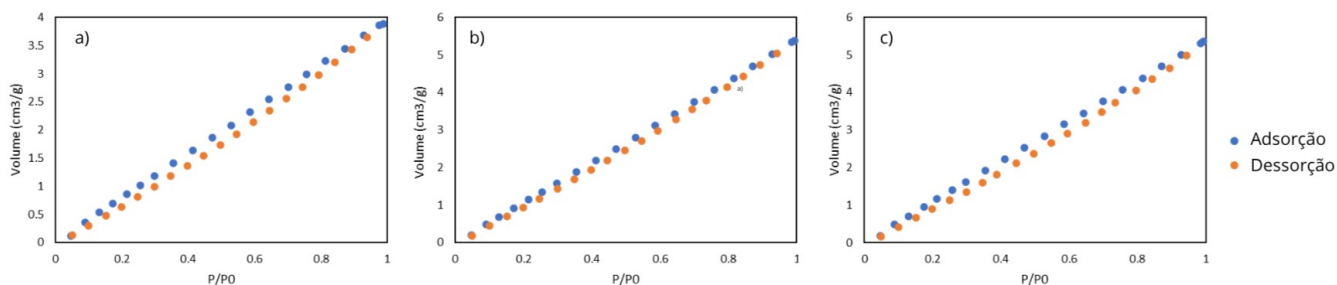
Análise termogravimétrica (figura 2) revelou que a perda de massa das partículas com aditivos foi maior que a controle. A primeira perda de massa, em torno de 200 °C, está associada com a evaporação de água. A perda de massa entre 200 e 300 °C pode ser associada com a despolimerização do alginato e a decomposição de componentes orgânicos (Ferreira et al., 2017). Acima de 300 °C há a decomposição dos polissacarídeos (Chen et al., 2022), e entre 600 e 700 °C a perda de massa pode ser explicada pela carbonização.

Figura 2. Análise térmogravimétrica das partículas P1, P2 e PL2.



As isotermas de N₂ para avaliar a superfície e a porosidade obtidas pelo método BET (Fig. 3) revelaram um grande volume de gás adsorvido por partícula. Este efeito foi evidenciado pelo ligeiro aumento na área superficial (áreas de P2 e PL2) em comparação com P1 (12,46 m²/g), tal aumento pode estar relacionado a incorporação dos aditivos, especialmente a lignina (presente em ambas formulações P2 e PL2).

Figura 3. Isotermas de adsorção/dessorção de N₂ das partículas P1 (a), P2 (b) e PL2 (c).



A tabela 4 reúne os parâmetros K_d, t_{1/2} e valor D para as partículas, inclusive para a enzima livre (EL). Percebe-se que a resistência térmica de cada partícula é menor para a enzima livre, e maior para a partícula que tem em sua composição líquido iônico e lignina comercial. Infere-se que a imobilização melhora a resistência térmica das partículas, e o tempo de meia vida possui um acréscimo ainda maior quando compara-se a diferença entre as partículas P2 e P1, e a P1 com a enzima livre. Ou seja, aparentemente é mais significativa a diferença quando junto à imobilização da enzima são utilizados aditivos como líquido iônico e lignina (principalmente a comercial).

Tabela 4. Resultados para a estabilidade em diferentes temperaturas, incluindo o K_d e o tempo de meia vida para cada formulação de partículas e para a enzima livre.

Parâmetros	60 °C				70 °C			
	P1	P2	PL2	FE	P1	P2	PL2	FE
K _d (min ⁻¹)	0,0067	0,0034	0,0054	0,0083	0,0171	0,0098	0,0161	0,0343
R ²	0,957	0,953	0,9975	0,9129	0,9024	0,999	0,8509	0,901
t _{1/2} (min)	103,45	203,87	128,36	83,51	40,5300	70,73	43,05	20,21
Valor D (min)	343,67	677,23	426,4	277,42	134,65	234,96	143,02	67,13

CONCLUSÕES:

A partir da caracterização das partículas, é possível fazer previsões sobre o seu comportamento e quais seriam as melhores condições do meio reacional para a sua utilização. As partículas mostraram-se satisfatórias em termos de resistência mecânica, estabilidade térmica e a pH, além do bom potencial para transferência de massa. Isso será estudado em estudos posteriores para a produção de biodiesel e citronela. Além disso, através dos experimentos observou-se acréscimos de qualidades positivas nas partículas com aditivos como o líquido iônico e a lignina, em comparação com as partículas imobilizadas contendo apenas enzima, principalmente no quesito resistência à temperatura. Ademais, as qualidades das partículas com a lignina proveniente do licor de pré-tratamento também apresentaram melhorias significativas em comparação com as que possuem apenas enzima imobilizada, mostrando que esse uso pode ser promissor, principalmente no quesito sustentabilidade, ao utilizar resíduos de outros processos.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, Francisco; SILVEIRA, Mariana; ALVIM, Isabela; COSTA, Talles; SILVA, Thiago; VIEIRA, Melissa; PRATA, Ana; FORTE, Marcus. **Jet cutter technique as a tool to achieve high lipase hydrolytic activity**. Food and Bioproducts Processing, Campinas, v. 137, p. 189-199, 2023.

ALMEIDA, Francisco; TRAVÁLIA, Beatriz; GONÇALVES, Igor; FORTE, Marcus. **Biodiesel production by lipase catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends**. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, Campinas, v. 15, p. 1141-1159, 2021.

BADGUJAR, Kirtikumar; BADGUJAR, Vivek; BHANAGE, Bhalchandra. **Recent update on use of ionic liquids for enzyme immobilization, activation, and catalysis: A partnership for sustainability**. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, Matunga, v.36, 2022.

BELL, Elizabeth; FINNIGAN, William; FRANCE, Scott; GREEN, Anthony; HAYES, Martin; HEPWORTH, Lorna; LOVELOCK, Sarah; NIIKURA, Haruka; OSUNA, Sílvia; ROMERO, Elvira; RYAN, Katherine; TURNER, Nicholas; FLITSCH, Sabine. **Biocatalysis**. Nature Reviews Methods Primers, v. 1, 2021.

BRADFORD, Marion. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Analytical Biochemistry, Athens, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHEN, Tao; LIU, Haochen; GAO, Jie; HU, Guowen; ZHAO, Yuan; TANG, Xiuqin; HAN, Xiaobing. **Efficient Removal of Methylene Blue by Bio-Based Sodium Alginate/Lignin Composite Hydrogel Beads**. Polymers, v. 14, n. 2917, 2022.

FERREIRA, Irlon; GANZELI, Luisa; ROSSET, Isac; YOSHIOKA, Sérgio; PORTO, A. **Ethyl Biodiesel Production Using Lipase Immobilized in Silk Fibroin-Alginate Spheres by Encapsulation**. Catalysis Letters, São Carlos, v. 147, p. 269-280, 2017.

GARLAPATI, Vijay; BANERJEE, Rintu. **Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification**. Enzyme Research, Kharagpur, v. 2013, 2013.

ISMAIL, Abdallah; BAEK, Kwang-Hyun. **Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects**. International Journal of Biological Macromolecules, Gyeongsan, v. 163, p. 1624-1639, 2020.

LIU, Can; Shi SHI, Jian. **Confined Enzymatic Esterification of Volatile Fatty Acids in Aqueous Solutions**. Kentucky, 2024. (Preprint)

PARK, Saerom; KIM, Sung; KIM, Ji; YU, Hyejeong; KIM, Hyung; YANG, Yung-Hun; KIM, Hyungsup; KIM, Yong; HA, Sung; LEE, Sang. **Application of cellulose/lignin hydrogel beads as novel supports for immobilizing lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Seoul, v. 119, p. 33-39, 2015.