

INTRODUÇÃO

- Lipases são enzimas versáteis e regioseletivas que agem nas ligações de ésteres carboxílicos. Porém, o alto custo e dificuldade de recuperação limitam o uso dessas enzimas na catálise.
- Uma estratégia para ultrapassar este desafio é a imobilização.
- Neste trabalho, dois novos materiais à base de sílica – MX e HpMX, sintetizados e caracterizados previamente – foram utilizados na imobilização da *Candida antarctica* Lipase B (CalB) e *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL).
- MX e HpMX são magnéticos (devido à presença de partículas de magnetita), sendo o primeiro um material não-hidrofóbico com apreciável área superficial ($143 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e o segundo, um material hidrofóbico (125° de ângulo de contato) com menor área de superfície ($61 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Esses materiais tiveram as atividades enzimáticas medidas e a possibilidade de reuso analisada, bem como parâmetros de tempo de imobilização, temperatura de reação e saturação do suporte foram otimizados.

EXPERIMENTAL

- Para a imobilização da lipase, suspensões de enzima diluídas com tampão fosfato ($0,079 \text{ U mL}^{-1}$ para TLL e $0,123 \text{ U mL}^{-1}$ para CalB) foram postas em contato com os materiais durante 12 h sob agitação mecânica, após os materiais foram lavados com tampão.
- Para os ensaios de atividade enzimática, a reação de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato foi utilizada (Fig.1), pois a liberação do *p*-nitrofenol pode ser acompanhada através do aumento na absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.
- O substrato foi oferecido aos suportes e, após 5 minutos sob agitação, o material foi separado magneticamente, realizando-se a leitura de absorbância do sobrenadante.
- Os valores de concentração foram obtidos através de uma curva de calibração. Uma unidade de atividade enzimática (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que converte $1 \mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenilpalmitato em *p*-nitrofenol em 1 minuto. As medidas foram realizadas a 25°C e em duplicata. Para a avaliação dos ciclos, o mesmo procedimento foi realizado em triplicata e lavagens com tampão entre os ciclos foram realizadas.

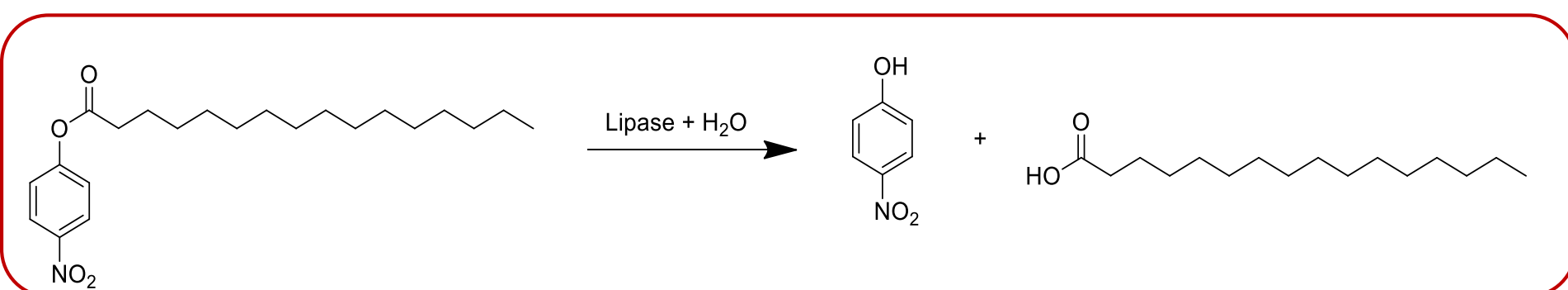


Figura 1: Reação de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Os resultados dos ensaios de atividade enzimática com os dois materiais e as duas enzimas são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Médias de atividade e porcentagem de imobilização de CalB nos materiais:

Materiais	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade (U g^{-1})
MX	8	2,0
HpMX	0	2,7
Livre CalB	Não se aplica	$0,123 \text{ U mL}^{-1}$

- As diferenças de rendimento de imobilização entre CalB e TLL podem ser atribuídas às diferentes diluições empregadas, o que torna o ambiente de imobilização da CalB mais viscoso e prejudica sua difusão até o interior dos poros dos suportes.

Tabela 2: Médias de atividade e porcentagem de imobilização de TLL nos materiais:

Materiais	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade (U g^{-1})
MX	36,4	5,7
HpMX	96,9	4,7
Livre TLL	Não se aplica	$0,079 \text{ U mL}^{-1}$

- Esses resultados indicam que, apesar do menor diâmetro de poro e área superficial específica, a hidrofobicidade do material HpMX exerce um papel importante na etapa de imobilização das enzimas. Já a exposição dos sítios ativos da enzima - que tem como consequência valores maiores de atividade - é favorecida pelo material não hidrofóbico e com maior volume de poros (MX).
- A enzima TLL foi escolhida para dar continuidade aos estudos de imobilização dos suportes devido a maior atividade e ambiente menos viscoso.
- Uma série de 5 ciclos foi realizada em triplicata com a enzima TLL imobilizada em MX e HpMX. Os resultados são mostrados na figura 2.

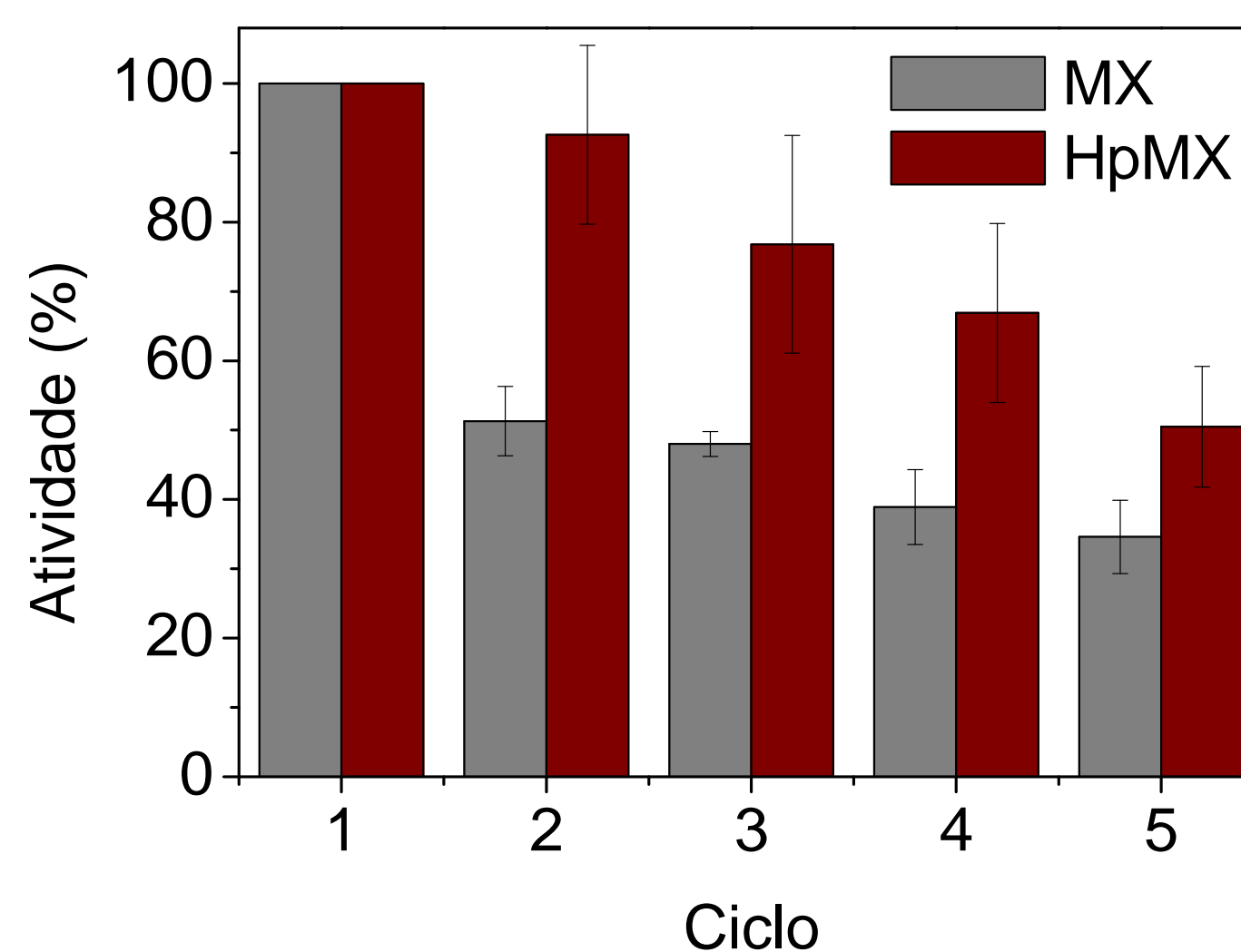


Figura 2: Resultados de reciclo da lipase TLL suportada nos materiais. As barras indicam o desvio do valor médio entre as triplicatas.

- Os resultados apresentados na figura 2 indicam que a hidrofobicidade do material HpMX é responsável por uma melhor interação entre suporte e enzima, pois a perda de atividade ao longo dos ciclos é menos acentuada que para o material MX.

CONCLUSÕES

- Neste trabalho, MX e HpMX desempenharam o papel de suporte para dois tipos de lipases (CalB e TLL).
- HpMX possui porcentagem de imobilização maiores para ambas as enzimas, o que demonstra que a forma de suportar lipases por interação hidrofóbica é mais eficiente que por adsorção.
- As atividades da enzima CalB suportada é comparável em ambos os suportes. Contudo, para a enzima TLL, a atividade é maior no suporte não-hidrofóbico. Essa diferença de valores de atividade fornece um indício sobre a maior disponibilidade dos sítios ativos da enzima no suporte MX.
- Os ensaios de reuso da enzima TLL indicam que o material HpMX mantém mais da metade da atividade após 5 ciclos.
- Diante do exposto, conclui-se que os materiais MX e HpMX têm potencial aplicação como suportes planejados para lipases.

AGRADECIMENTOS