

## Lipase Imobilizada em Sílica para Síntese de Ésteres

Douglas S. Charqueiro<sup>1</sup>, Anike H. Virgili<sup>1</sup>, Edilson V. Benvenutti<sup>1</sup>, Rafael C. Rodrigues<sup>2</sup>, Eliana W. de Menezes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LSS—Laboratory of Solids and Surfaces, Instituto de Química, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil

<sup>2</sup>Biocatalysis and Enzyme Technology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Avenue, P.O. Box 15090, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil

\*[eliana.weber@ufrgs.br](mailto:eliana.weber@ufrgs.br)

### Resumo/Abstract

#### RESUMO

Neste trabalho, xerogel mesoporoso de sílica foi obtido e organofuncionalizado com 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTMS). O material apresentou área superficial específica de aproximadamente 160 m<sup>2</sup>/g e mesoporos com máximo de distribuição de tamanho em torno de 22 nm, sendo usado como suporte para imobilização de lipase *Candida antarctica* B (CalB). O biocatalisador suportado foi aplicado na reação de síntese do éster butirato de butila. Ensaios de reuso foram realizados para avaliação do desempenho catalítico do biocatalisador heterogêneo.

**Palavras-chave:** Xerogel mesoporoso, imobilização enzimática, lipase, suporte de sílica, biocatalisador

#### ABSTRACT

In this work, a mesoporous silica xerogel was obtained and organofunctionalized with 3-glycidoxipropyltrimetoxysilane (GPTMS). The material presented surface area of 160 m<sup>2</sup>/g and mesopores with maximum of pore size distribution in around 22 nm. It was used as support for *Candida antarctica* B (CalB) lipase. The supported biocatalyst was applied in the synthesis of butyl butyrate ester. The reuse assays were carried out to evaluate the catalytic performance of the heterogeneous biocatalyst.

**Keywords:** Mesoporous xerogel, enzyme immobilization, lipase, silica support, biocatalyst

### Introdução

Enzimas exibem um papel importante como catalisadores biológicos, apresentando alta atividade, seletividade e especificidade.<sup>1</sup> Adicionalmente, em comparação com os catalisadores químicos, as reações catalisadas por enzimas ocorrem em condições brandas de temperatura. Contudo, para viabilizar economicamente a sua aplicação industrial, é necessária sua recuperação e reuso. Nesse sentido, a imobilização de enzimas em suportes sólidos, além do reuso, também proporciona uma melhora na estabilidade térmica, tolerância ao pH e desempenho em solventes orgânicos, em comparação com a enzima livre.<sup>2</sup> A imobilização de enzimas pode ocorrer por métodos físicos (adsorção e aprisionamento) e químicos (ligação covalente e reticulação). A imobilização física é um método que não altera a conformação da enzima, além de permitir sua mobilidade. Por outro lado, a imobilização química contribui para uma alta eficiência catalítica, estabilidade e baixa resistência à transferência de massa da enzima imobilizada.<sup>3</sup>

Dentre os suportes empregados para a imobilização, a sílica tem merecido destaque, pois apresenta biocompatibilidade, rigidez estrutural, alta resistência térmica, estabilidade química, atoxidade e elevada área

específica, que são características importantes que devem ser consideradas na preparação de um biocatalisador heterogêneo. Através do método sol-gel é possível sintetizar materiais híbridos contendo sílica, com propriedades texturais controladas, já que estas reações ocorrem de forma lenta, possibilitando interferências através de variações nos parâmetros que afetam as etapas de síntese.<sup>4</sup> Nesta técnica, a solução coloidal chamada “sol”, que consiste em um precursor de sílica, água e um solvente sofre reações de hidrólise e condensação. Devido às reações de condensação, inicia-se o processo de gelificação com formação das pontes de siloxano (Si–O–Si), levando à uma estrutura de rede tridimensional. Por fim, o solvente que preenche os poros do gel é removido através da evaporação, dando origem à estrutura morfológica do produto final. Os materiais produzidos por este método podem formar uma rede de sílica tridimensional, que pode ser quimicamente modificado com variados grupos funcionais de interesse, atribuindo propriedades químicas específicas.<sup>5</sup>

Organossilanos podem ser empregados como agentes modificadores da superfície de sílica através de reação de enxerto com os grupos silanóis. Essa estratégia permite a funcionalização da sílica com variados grupos orgânicos de interesse.<sup>6</sup> A funcionalização da sílica com o organossilano 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTMS) torna possível a

imobilização covalente de enzimas, através da reação com grupos amino primários (-NH<sub>2</sub>), grupos hidroxilas (-OH) e grupos tióis (-SH). Nesse caso, a imobilização pode ocorrer de forma direta, sem a presença de agentes de reticulação, tais como glutaraldeído.<sup>7</sup>

Lipases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. Essas enzimas catalisam a conversão de lipídeos em ácidos graxos, e a síntese de ésteres a partir de ácidos graxos e álcoois. Dentre elas, destaca-se a enzima lipase *Candida antarctica B* (CalB), que é formada por 317 aminoácidos e possui estrutura globular de aproximadamente 30Å × 40Å × 50Å.<sup>8</sup> Esta enzima vem sendo empregada na indústria farmacêutica de cosméticos, bem como de detergentes, couro, alimentos (sabor e aroma). Suas inúmeras aplicações são devido à sua ampla seletividade e alta tolerância à solventes orgânicos e temperatura. Dentre estas aplicações inclui-se a síntese enzimática de ésteres flavorizantes.

Os ésteres encontrados na natureza são compostos aromáticos que possuem como características suas notas frutadas e alta volatilidade. Na indústria, esses compostos chamam atenção por seus diversos usos, tais como: aromas, agentes emulsificantes, umectantes, entre outros. Estes compostos aromatizantes podem ser obtidos por extração direta de fontes naturais ou por síntese química. Industrialmente, as fontes naturais de ésteres de aromas têm um baixo rendimento de produção, causando um aumento no custo do processo reacional.<sup>9</sup> Já a síntese química da reação de esterificação pode ser considerada como um processo catalítico menos atraente, pois ocorre sob altas temperaturas e pressões, também com o uso de altas concentrações de ácidos e solventes tóxicos, podendo resultar em danos ambientais.<sup>10</sup> Além disso, não há seletividade do substrato, o que faz com que ocorram subprodutos indesejáveis, reduzindo a eficiência do processo. Assim, devido à maior especificidade das lipases, o rendimento destas reações pode aumentar, utilizando condições mais brandas.

Neste trabalho, um xerogel de sílica foi sintetizado e empregado como suporte para a imobilização de enzimas lipase, *Candida antarctica B* (CalB). Este xerogel foi sintetizado e posteriormente organofuncionalizado com GPTMS, sendo designado como Si-GPTMS. Ensaios de imobilização de enzimas no suporte foram realizados utilizando-se tampão fosfato. O biocatalisador suportado foi aplicado na reação de síntese do éster butirato de butila. Testes de reuso também foram realizados para avaliação do desempenho catalítico do biocatalisador heterogêneo.

## Experimental

**Síntese do Xerogel de Sílica e organofuncionalização:** O suporte foi obtido pelo método sol-gel, utilizando TEOS, etanol e catalisador ácido (HF/HCl). Após gelificação, o material foi envelhecido por 10 dias, seco, peneirado e separado em granulometria de 20–35 Mesh. Para a organofuncionalização, a sílica foi ativada e reagiu com GPTMS em tolueno, sob agitação e atmosfera de N<sub>2</sub> a 80 °C por 24 h. O produto funcionalizado foi denominado Si-GPTMS.

**Imobilização da Enzimas lipase CalB:** Enzima lipase foi imobilizada em Si-GPTMS a partir de solução tampão fosfato pH 7,0, por 20 h soluções usando 10 mg de enzima para cada grama de suporte. O biocatalisador gerado foi nomeado como SiGCalB-X, onde X é a concentração do tampão 0,1 e 1,0 mol/L. Foram calculados o rendimento, eficiência e atividade recuperada da imobilização.

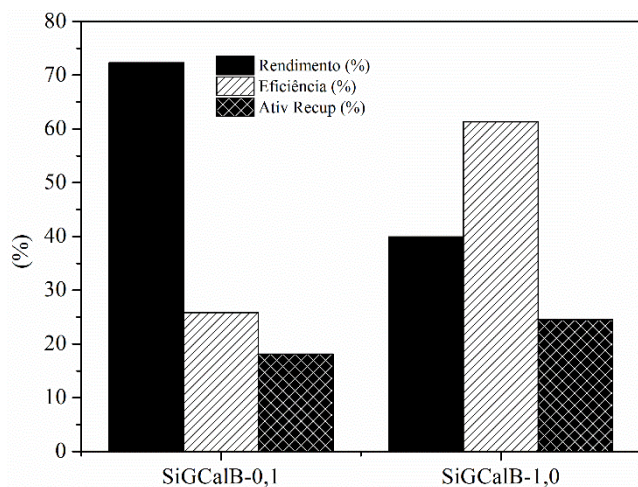
**Quantificação de proteínas; Atividade enzimática (hidrólise de p-NPP) e Estabilidade térmica:** Utilizou-se o método de Bradford com curva padrão de BSA para determinar a quantidade de proteína a ser imobilizada. A atividade enzimática foi avaliada pela liberação de p-nitrofenol, monitorada a 410 nm. A unidade de atividade foi definida como 1 μmol de p-nitrofenol/min. Para os testes de estabilidade térmica, as enzimas livre e imobilizada foram expostas a temperaturas entre 50–80 °C. A atividade relativa foi comparada com o controle (sem aquecimento).

**Reação de Esterificação e ensaios de reuso:** A esterificação entre ácido butírico e n-butanol, catalisada por CalB livre ou imobilizada, foi monitorada por titulação do ácido residual. O rendimento da reação foi calculado. O biocatalisador foi reutilizado por várias vezes em reações de esterificação, sendo lavado e armazenado entre os ciclos.

**Caracterizações:** Incluem análises texturais por adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>, análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

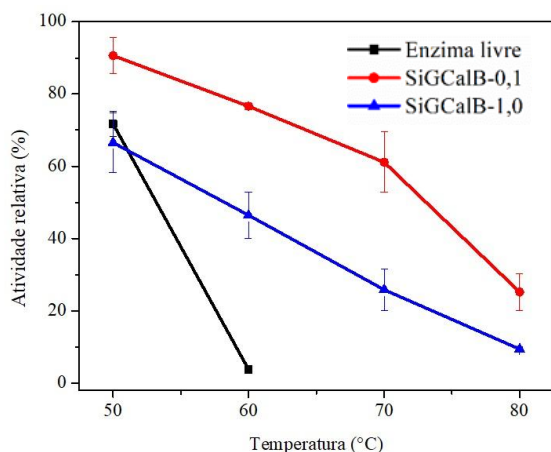
## Resultados e Discussão

Os parâmetros de imobilização para os catalisadores SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0 são mostrados na Figura 1. Comparando-se SiGCalB-0,1 com SiGCalB-1,0, a imobilização em tampão com concentração mais baixa (0,1 mol/L) resultou em um maior rendimento de imobilização. Porém, em concentração mais elevada (1,0 mol/L) observou-se uma maior eficiência e também uma maior atividade recuperada, indicando que o aumento na força iônica da solução tampão favoreceu a ligação da enzima no suporte.



**Figura 1.** Parâmetros de imobilização para os biocatalisadores SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0.

A estabilidade térmica da enzima livre e da enzima imobilizada no suporte (SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0), foi avaliada nas temperaturas de 50 a 80 °C em um tempo fixo de 1 h, através da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). Esses resultados são apresentados na Figura 2, onde pode-se observar que a enzima livre, após 1h a 60 °C, praticamente não apresenta mais atividade. Já, para as enzimas imobilizadas (SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0), observa-se um decaimento da atividade relativa com o aumento da temperatura, porém, SiGCalB-0,1 revelou-se mais estável termicamente na reação de hidrólise do que SiGCalB-1,0.

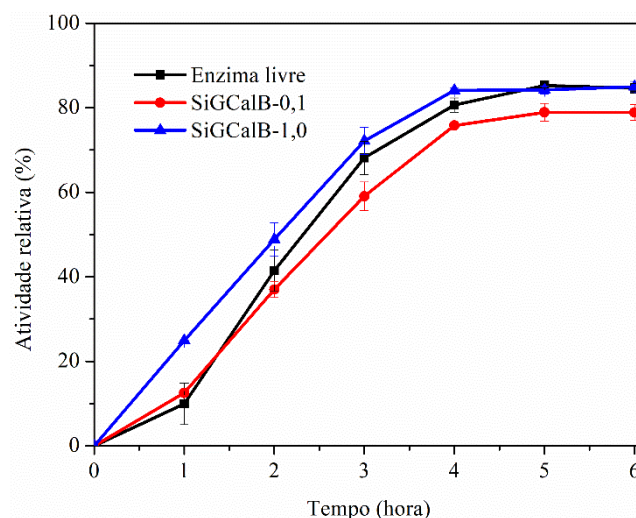


**Figura 2.** Estabilidade térmica da enzima livre em tampão fosfato de sódio e enzima imobilizada (SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0), após 1h e temperatura entre 50 e 80 °C.

Os resultados da conversão de butirato de butila em diferentes tempos de reação com o uso dos biocatalisadores (SiGCalB-0,1, SiGCalB-1,0 e enzima livre) são

apresentados na Figura 3. Pode-se observar que as maiores conversões foram obtidas a partir de 4 h de reação, atingindo 85% com o uso da enzima livre e do biocatalisador SiGCalB-1,0 e aproximadamente 80% com o uso de SiGCalB-0,1. As maiores conversões obtidas para o biocatalisador SiGCalB-1,0, em relação a SiGCalB-0,1 podem ser atribuídas a eficiência na imobilização da enzima no suporte, que proporciona uma maior interação enzima-substrato, diminuindo os efeitos difusionais e aumentando a taxa inicial da reação.

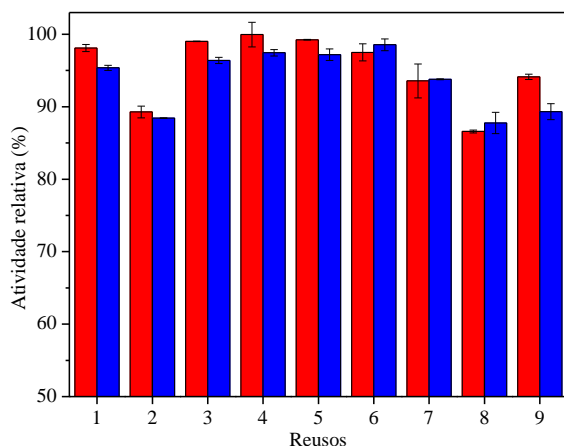
O uso da enzima livre tem a vantagem de ter a interação com o substrato em nível molecular, sem limitações de transferência de massa ou problemas de obstrução. Porém, esta não pode ser reutilizada, o que a torna economicamente inviável.



**Figura 3.** Conversão em butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1, 100 µL da enzima livre em tampão fosfato de sódio pH 7 0,1 mol/L e 100 mg de biocatalisador imobilizado (SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0).

Ensaio de reuso dos biocatalisadores, SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0, na reação de esterificação do butirato de butila, foram realizados nas mesmas condições apresentadas acima, porém com 3h de reação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.

Os resultados de reuso indicam que os biocatalisadores, após lavagem com n-hexano mantém aproximadamente 90% de sua atividade inicial após 9 ciclos de reação. O processo de lavagem com n-hexano, após cada reação, é necessário para recuperar a atividade enzimática inicial devido ao acúmulo de ácido e água no local ativo da enzima. Como já foi observado em outros trabalhos, a lavagem com o solvente, após cada ciclo de reação, demonstrou efeito positivo na estabilidade da enzima.



**Figura 4.** Reuso dos biocatalisadores SiGCalB-0,1(vermelho) e SiGCalB-1,0(azul) na reação de esterificação do butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1; 3h e 100 mg de biocatalisador.

Os biocatalisadores, SiGCalB-0,1 e SiGCalB-1,0, apresentaram estabilidade operacional semelhante na síntese do éster butirato de butila, permanecendo ativos após 9 ciclos de 3 h, em reações que aconteceram ao longo de 40 dias. A diminuição da atividade catalítica residual pode ser devido a danos mecânicos, inibição do produto final e desativação do biocatalisador durante o ensaio de reciclo ou lavagem contínua com solvente.

## Conclusões

Neste trabalho, sílica mesoporosa foi obtida pelo método sol-gel e organanofuncionalizada com 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano. O material foi usado como suporte para imobilização de enzima CalB e aplicado com sucesso na reação de síntese do éster butil butirato atingindo 80 a 85% de conversão em até 6 h de reação a 50 °C. Os ensaios de reuso dos biocatalisadores mostraram que após 9 ciclos de 3h, os mesmos mantêm aproximadamente 90% da atividade inicial.

## Agradecimentos

FINEP – MULTIMAT (01.22.0231.00), CNPq, CAPES e FAPERGS.

## Referências

- Rodrigues, R.C., Virgen-Ortíz, J.J., dos Santos, J.C.S., Berenguer-Murcia, A., Alcantara, A.R., Barbosa, O., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R.; Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.*, **2019**, 37, 746.
- Dal Magro, L., de Moura, K.S., Backes, B.E., de Menezes, E.W., Benvenuti, E.V., Nicolodi, S., Klein, M.P., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C.; Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnol. Rep.*, **2019**, 24, e00373.
- Kołodziejczak-Radzimska, A., Nghiem, L.D., Jesionowski, T.; Functionalized materials as a versatile platform for enzyme immobilization in wastewater treatment. *Curr. Pollut. Rep.*, **2021**, 7, 263.
- Esposito, S.; “Traditional” sol-gel chemistry as a powerful tool for the preparation of supported metal and metal oxide catalysts. *Materials*, **2019**, 12, 668.
- Benvenuti, J., Capeletti, L.B., Gutierrez, M., dos Santos, J.H.Z.; Hybrid sol-gel silica adsorbent materials synthesized by molecular imprinting for tannin removal. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2018**, 85, 446.
- Wang, Z., Liu, M.-c., Chang, Z.-y., Li, H.-b.; Study on the graft modification mechanism of macroporous silica gel surface based on silane coupling agent vinyl triethoxysilane. *RSC Adv.*, **2021**, 11, 25158.
- Carboni, D., Pinna, A., Malfatti, L., Innocenzi, P.; Smart tailoring of the surface chemistry in GPTMS hybrid organic-inorganic films. *New J. Chem.*, **2014**, 38, 1635.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A.; The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, **1994**, 2, 293.
- Elias, N., Wahab, R.A., Chandren, S., Rasak, F.I.A., Jamalis, J.; Effect of operative variables and kinetic study of butyl butyrate synthesis by *Candida rugosa* lipase activated by chitosan-reinforced nanocellulose derived from raw oil palm leaves. *Enzyme Microb. Technol.*, **2019**, 130, 109367.
- Xin, F., Zhang, W., Jiang, M.; Bioprocessing Butanol into More Valuable Butyl Butyrate. *Trends Biotechnol.*, **2019**, 37, 923.