

Imobilização de Esterase de Fígado Suíno em Sílica e Caracterização do Imobilizado.

João B. Medeiros¹(IC), Carolina R. Biasetto¹(IC), Helen C. F. Lisboa¹(PG), Henrique C. Trevisan¹(PQ)

¹UNESP, Instituto de Química, Departamentode Bioquímica e Tecnologia Química, Rua Francisco Degni, s/n, Araraquara, SP, Brasil, 14800-900, e-mail: medeirosunesp@yahoo.com.br

Palavras Chave: PLE, imobilização, biocatalise).

Introdução

A síntese de compostos enantiomericamente puros é um seguimento da síntese orgânica em franco desenvolvimento, sobretudo com aplicação na indústria farmacêutica. Em grande parte dos casos a rota sintética passa por etapas que podem ser biocatalisadas por microrganismos ou enzimas isoladas, como as esterases, que catalisam a hidrólise de ésteres. Entre as esterases, a de fígado suíno (PLE) é a mais importante em síntese orgânica¹, podendo ser aplicada em hidrólise branda, hidrólise regioseletiva, separação de isômeros E/Z, assimetriação de diésteres pró-quirais e resolução de ésteres racêmicos.

A aplicação de enzimas em processos industriais é viabilizada pela sua imobilização em suportes sólidos, pois possibilita seu reaproveitamento e uso contínuo, além da possibilidade de conferir maior estabilidade ao biocatalisador. Considerando as vantagens relacionadas ao uso de enzimas imobilizadas e a aplicabilidade da PLE objetivou-se estudar metodologias para sua imobilização em sílica microporosa e caracterizar o imobilizado, visando emprego em biocatalise.

Resultados e Discussão

A atividade enzimática foi calculada a partir do volume de NaOH 0,05 mol L⁻¹ consumido para neutralizar o ácido butírico liberado na hidrólise do butirato de etila, a 25 °C e pH 7,96-8,02.

A PLE foi extraída e purificada de acordo com metodologia descrita na literatura².

A imobilização foi avaliada via adsorção física e ligação covalente. No primeiro caso, sílica com granulometria 150-300 µm e derivatizada com γ-aminopropiltrietóxisilano foi adicionada à solução dialisada de PLE, enquanto que no segundo a sílica foi ativada com solução de glutaraldeído 2,5% e lavada, antes de ser adicionada à solução da enzima. Verificou-se capacidade do suporte de imobilizar 490 U g⁻¹ pelo método de adsorção e 500 U g⁻¹ via glutaraldeído.

A atividade imobilizada medida foi de 290 U g⁻¹ para o método da ligação química e 158 U g⁻¹ para o de adsorção, sendo esse descartado devido à menor atividade. Estudo mostrou que quanto menor o

tamanho da sílica, maior a atividade do imobilizado. Ponderando-se entre atividade ótima e facilidade de manuseio, optou-se por usar como suporte sílica com granulometria 45-106 µm. Após otimização a atividade medida ficou na faixa de 900 U g⁻¹ (compara-se a 800-1600 U g⁻¹, da Sigma).

Observou-se que a diálise em membrana de 100 kDa de peso molecular de corte, aumenta a quantidade de enzima imobilizada à sílica, provavelmente por retirar proteínas que podem estar competindo pela superfície do suporte.

A atividade da PLE foi avaliada em presença de acetona como co-solvente, tendo apresentado um aumento de 75% para a enzima solúvel e 20% para a imobilizada. Também foi avaliado o efeito da temperatura sobre a PLE na faixa de 4-45 °C: para a enzima solúvel a atividade dobrou a cada intervalo de ~16 °C, de maneira que os resultados ajustaram-se à equação de Arrhenius. No caso da PLE imobilizada não se observou aumento significativo da atividade com a elevação da temperatura, o que pode ser explicado por efeito de resistência difusional interna.

A PLE imobilizada apresentou maior estabilidade térmica que a solúvel, a temperaturas superiores a 57,5 °C; e tempo de meia vida relativamente alto, 6,2 horas, a 57,5 °C. A atividade da PLE imobilizada diminuiu 50% após 18 ensaios com 3 diferentes substratos (135 h totais de uso).

Com relação à estabilidade de estocagem a 4 °C, a PLE imobilizada ficou estável por pelo menos 20 meses, enquanto a solúvel perdeu 20% da atividade após 14 meses de armazenamento.

Conclusões

Com esse trabalho imobilizou e caracterizou-se um importante biocatalisador em síntese orgânica. A PLE imobilizada continua sendo estudada quanto à sua estabilidade operacional. Também está se estudando seu uso em reatores de batelada e leito fixo, visando aplicações em síntese assimétrica.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo suporte financeiro e bolsa de IC.

¹ FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 4th ed. Springer-Verlag, Berlin, 2000.

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

² TREVISAN, H. C. MEDEIROS, J.B. LISBOA, H. C. F. Química
Nova, 29, 4, 2006.