

## Aplicação de técnica de planejamento experimental na otimização do processo de imobilização de lacase em quitosana por ligação cruzada.

Everton Skoronski<sup>1,2</sup> (PG), Jair Juarez João<sup>1</sup> (PQ), Carlos Henrique Lemos Soares<sup>3</sup> (PQ) e Agenor Fúrigo Júnior<sup>2</sup> (PQ). [everton.skoronski@unisul.br](mailto:everton.skoronski@unisul.br).

<sup>1</sup>Universidade do Sul de Santa Catarina – Curso de Engenharia Química – Grupo de Pesquisas em Catálise Enzimática e Síntese Orgânica. 88.704-900 Tubarão – SC

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – Depto. de Engenharia Química - Caixa Postal 476 – 88.040-900 Florianópolis– SC

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – Depto. de Bioquímica - Caixa Postal 476 – 88.040-900 Florianópolis– SC

Palavras Chave: lacase, quitosana, imobilização, planejamento experimental e ligação cruzada.

### Introdução

A aplicação de enzimas em processos industriais torna-se mais atrativa quando o catalisador pode ser imobilizado em um suporte inerte ao meio reacional, possibilitando sua fácil separação após a reação, além de conferir maior estabilidade ao catalisador, permitindo também que ela possa ser reutilizada em vários ciclos experimentais. Uma das técnicas de imobilização, ligação cruzada, apresenta várias vantagens frente aos demais métodos existentes, como exemplo o fato de a enzima ficar ligada ao suporte por ligação química covalente dificultando seu arraste do suporte por mecanismos de difusão ou advecção do meio reagente.

Em se tratando de suportes para essa imobilização, a quitosana vem sendo aplicada em alguns trabalhos<sup>1,2</sup>, sendo esse um biopolímero, obtido a partir da quitina, bastante abundante na natureza, estando somente abaixo da celulose em termos de disponibilidade. Estudos demonstram que esse biopolímero pode ser utilizado para confecção de suportes enzimáticos obtidos por ligação cruzada, uma vez que apresentam grupos amino na estrutura, necessários para realização das ligações cruzadas. A otimização deste processo é importante para que este suporte enzimático seja aplicado em reações de oxidação de matéria orgânica.

O objetivo desse trabalho foi otimizar as condições para o processo de imobilização por ligações cruzada entre enzimas lacases e a quitosana que foi usada como suporte enzimático nesse estudo.

### Resultados e Discussão

A enzima utilizada foi a lacase *Aspergillus sp.* obtida a partir da NOVOZYMES. As cápsulas foram preparadas dissolvendo a quitosana (0,25g) em solução de ácido acético 5% (m/v) (12,5mL). O gel formado foi gotejado com bomba peristáltica em solução de NaOH 2M para precipitação das cápsulas. Essas permaneceram em solução por 12 horas. Em seguida as cápsulas foram separadas e lavadas com água deionizada até pH=8,0 e expostas em solução de glutaraldeído para entrecruzamento, sendo posteriormente

mergulhadas em solução enzimática em diferentes condições de pH. Os fatores concentração de glutaraldeído (0,5 a 4,5 %), tempo (1,0 a 5,0 h) e pH (3,5 a 5,5) de imobilização foram avaliados em relação à sua influência sobre a atividade enzimática do biocatalisador obtido. A combinação dos fatores foi definida através de um planejamento de experimentos do tipo delineamento composto central rotacional, com repetição do ponto central (DCCR). A atividade enzimática foi determinada a partir da reação característica com reagente siringaldazina.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que existem faixas de valores para os fatores analisados, que exercem significativa influência sobre a atividade da lacase. Com relação ao efeito da concentração de glutaraldeído, existe uma tendência para um aumento na atividade da enzima após a imobilização quando são aplicadas soluções de glutaraldeído próximas de 0,5%. Com relação ao pH, pode-se afirmar que dentro da faixa estudada (3,5 a 5,5), a atividade enzimática é favorecida nos valores mais baixos de pH enquanto que para valores mais elevados existe uma tendência à desnaturação das proteínas. Com relação ao tempo, verifica-se que intervalos mais curtos aplicados para o processo de imobilização (1 hora) apresentam melhores condições para a obtenção de lacases imobilizadas com maiores valores de atividade em relação aos experimentos que apresentaram prazos mais estendidos.

### Conclusões

Através dos resultados podemos concluir que, dentre os fatores estudados, as melhores condições de imobilização podem ser atingidas em pH ácido (3,5 a 4,0), com reduzida concentração de glutaraldeído (0,5%) e curto intervalo de tempo de imobilização (1 horas).

### Agradecimentos

UNISUL, UFSC e NOVOZYMES

<sup>1</sup> Goosen, M. E. A. *Technomic Publishing Company*, Lancaster. 1996.

<sup>2</sup> Khor, E.; Lim, L. Y. *Biomaterials*. 2003, 24, 2339 – 2349.