

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ESTERASE DE FÍGADO SUÍNO. Carolina Rabal Biasetto¹ (IC), João Batista de Medeiros¹ (IC), Henrique Celso Trevisan¹ (PQ).- Tecnologia Química – Química - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química – Campus de Araraquara.

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 microorganismos ou enzimas isoladas, como as esterases, que catalisam a hidrólise de ésteres. Entre as esterases, a de fígado de porco (PLE) é a mais importante em síntese orgânica, aplicada em hidrólise branda, hidrólise regioseletiva, separação de isômeros E/Z, assimetriação de diésteres pró-quirais e resolução de ésteres racêmicos. Comercialmente, a PLE pode ser adquirida na forma bruta (~15U/mg, R\$8,88/kU), purificada (~150U/mg, R\$64,95/kU), ou imobilizada (~1200U/g, R\$4300,00/kU)¹. Considerando a importância, o custo e necessidade de importação da PLE, objetivou-se estudar metodologia para sua extração, estabilização e imobilização em sílica microporosa, visando emprego em biocatálise.

Baseando-se em metodologia descrita na literatura, inicialmente preparou-se o pó acetônico e em seguida extraiu-se e purificou-se a PLE nele presente². Aplicou-se também método alternativo, sem secar o pó acetônico³. As etapas de extração e purificação foram acompanhadas por análise de atividade nos sólidos e sobrenadantes. 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, em pH 8,0, em função do tempo.

A imobilização foi avaliada via adsorção física e ligação covalente. No primeiro caso, sílica com granulometria 150-300 µm e derivatizada com 3-aminopropiltriétoxissilano foi adicionada à solução dialisada de PLE. 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 até 500 U g⁻¹ via glutaraldeído e 490 U g⁻¹ pelo método de adsorção.

A atividade imobilizada medida foi de 290 U g⁻¹ para o método de 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, chegando a 1170 U g⁻¹ para as menores partículas (Figura 1). Ponderando-se entre a 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). Pelo fato da quantidade de enzima ligada ao suporte variar pouco com o aumento do tamanho da partícula de sílica, a curva de efetividade da imobilização seguiu a mesma tendência da de atividade (Figura 1).

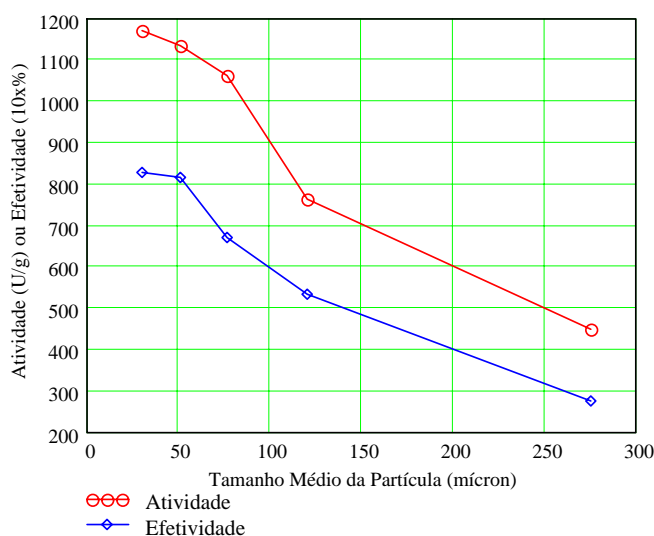


Figura 1. Efeito do tamanho da partícula de suporte sobre a atividade da PLE imobilizada.

Observou-se também 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.

O estudo de estabilização da enzima foi realizado primeiramente através do seu tratamento com solução de poliglutaraldeído (Figura 2), depois variando a quantidade do glutaraldeído adicionado na etapa de imobilização (Figura 3) e através de co-imobilização da PLE com soro de albumina bovina (Figura 4). Embora os tratamentos representassem métodos propostos e eventualmente bem sucedidos na literatura, os resultados não foram satisfatórios para o caso da PLE.

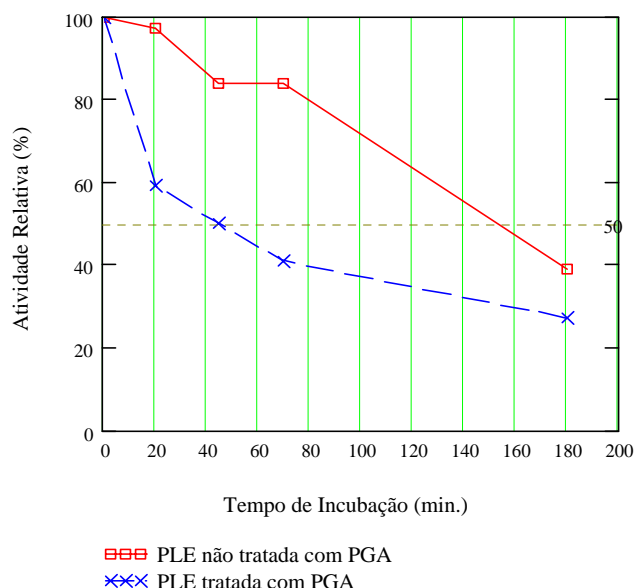


Figura 2. Inativação da PLE imobilizada tratada e não tratada com PGA, 57,5 °C.

A atividade da enzima 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, a atividade da PLE solúvel dobrou a cada intervalo de ~16 °C, na faixa de 4-45 °C.

A PLE imobilizada apresentou menor estabilidade térmica que a solúvel, a 57,5°C. Com relação à estocagem a 4 °C, a enzima imobilizada ficou estável por pelo menos quinze meses, enquanto a solúvel perdeu 20% da atividade após oito meses de estocagem.

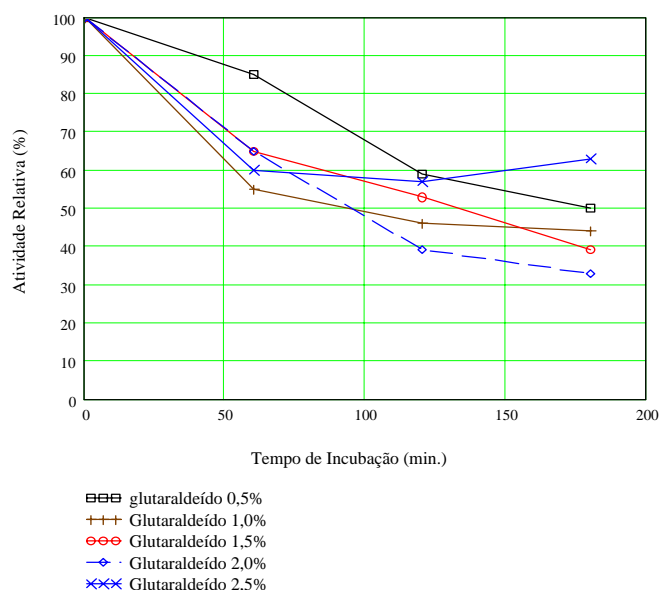


Figura 3. Inativação da PLE imobilizada variando-se a quantidade de glutaraldeído, 60 °C.

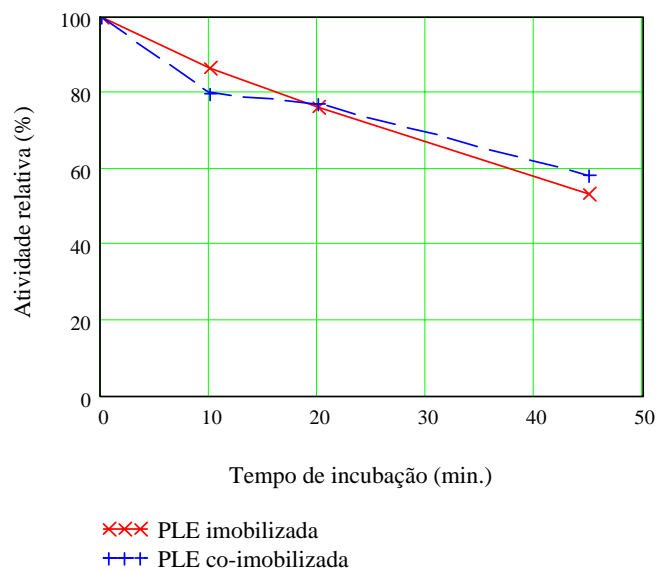


Figura 4. Inativação da PLE imobilizada e co-imobilizada com BSA, 57,5 °C.

Com este trabalho isolou e imobilizou-se um importante biocatalisador em síntese orgânica, como alternativa à importação. Aplicação de técnicas de estabilização descritas ou não na literatura não resultaram em aumento de estabilidade da PLE em temperaturas acima de 57,5°C. Considerando que as etapas de imobilização e estabilização da PLE foram concluídas, pretende-se estudar seu uso em reatores tipo batelada e de leito fixo, visando aplicações em síntese assimétrica.

Referências Bibliográficas

¹Estimativa da Sigma-Aldrich em: <http://www.sigma-aldrich.com.br/>

² BASAK, A.; NAG, A.; PANCHAL, S.C.; BHATTACHARYA, G. Selectivity in enzyme catalyzed reaction - preferential hydrolysis of saturated methyl-ester over the corresponding unsaturated ester by pig-liver esterase. **Biotechnology Letters**, v.15, n.1, p.19-22, 1993.

³TREVISAN, H.C. MEDEIROS, J.B. LISBOA, H.C.F. Extração de esterase de fígado suíno (PLE). **Química Nova**, v.29, n.4, p.865-867, 2006.

Bolsa: CNPq