

Imobilização de lipases em suporte com nanopartículas magnéticas

Lipase immobilization on magnetic nanoparticles support

RESUMO

Lipases são enzimas utilizadas em diversos setores industriais devido sua versatilidade em catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, entre outras. Geralmente, estas enzimas são utilizadas em sua forma imobilizada. As nanopartículas magnéticas têm sido estudadas nas últimas décadas e o seu uso na imobilização de enzimas se é promissor, pois o biocatalisador pode ser recuperado pela simples aplicação de um campo magnético. Neste trabalho, a lipase do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi produzida por fermentação submersa e imobilizada em nanopartículas magnéticas (NPM) e nanopartículas magnéticas impregnadas em carvão (NPMC), como também em carvão ativado proveniente de resíduo de jeans. As nanopartículas magnéticas de Fe foram produzidas através de maceração de seus materiais precursores. A síntese de Fe_3O_4 foi realizada com sucesso e a imobilização de lipases no material NPMC alcançou alto valor de atividade enzimática ($241,3 \pm 26,6$ U/g_{suporte}). Esta enzima se mostrou promissora para ser aplicada na reação de hidroesterificação para a produção de ésteres de biodiesel.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase. Adsorção. Fe_3O_4 . Carvão ativado. Resíduo de jeans.

ABSTRACT

Lipases are enzymes used in many industrial sectors due to their versatility in catalyzing hydrolysis, esterification, transesterification reactions, among others. Generally, these enzymes are used in their immobilized form. Magnetic nanoparticles have been studied in recent decades and their use in enzyme immobilization is promising, as the biocatalyst can be recovered by simply applying a magnetic field. In this work, *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase was produced by submerged fermentation and immobilized on magnetic nanoparticles (NPM) and activated carbon-impregnated magnetic nanoparticles (NPMC), as well as on activated carbon from denim fabric waste. Magnetic Fe nanoparticles were produced by macerating their precursor materials. The synthesis of Fe_3O_4 was successfully performed and lipase immobilization in the NPMC material reached a high enzyme activity value (241.3 ± 26.6 U/g_{support}). This enzyme was promising to be applied in the hydroesterification reaction for biodiesel ester production.

KEYWORDS: Lipase. Adsorption. Fe_3O_4 . Activated carbon. Denim fabric waste.

Vitor Quitto Amaral Reis

vitorquitto01@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Taynná Cristina da Cunha Ferreira

taynna_cris@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Taís Larissa da Silva

taisilva@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Alessandra Machado Baron

alessandrab@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Patrícia Salomão Garcia

patriciagarcia@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Rafael Block Samulewski

samulewski@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade

milenaandade@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Apucarana, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

INTRODUÇÃO Página | 2

Nas últimas décadas as nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas em diversas áreas da Biotecnologia. O seu uso como suportes para imobilizar enzimas tem chamado a atenção por facilitar a recuperação do biocatalisador do meio reacional (PASHANGEH et al., 2017).

As enzimas são consideradas como os catalisadores da natureza. Dentre as vantagens estão alta especificidade, reduzindo as reações colaterais e atuam em condições brandas de temperatura e pressão (HASAN et al., 2006). As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos que incluem bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos. Estas enzimas são utilizadas em diversos setores industriais devido a sua versatilidade em catalisar reações de hidrólise, aminólise, esterificação, transesterificação, entre outras (SHARMA et al., 2001).

Geralmente, as enzimas são utilizadas em sua forma imobilizada que permite a sua recuperação e o uso repetidas vezes. Diversos métodos propostos para imobilização de enzimas podem ser utilizados. A adsorção é o mais simples e o mais empregado, que consiste no simples contato da enzima com o suporte através de ligações de baixa energia como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (BALCÃO et al., 1996; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Este trabalho propõe a produção de um suporte a partir de nanopartículas magnéticas impregnadas em carvão para imobilizar por adsorção as lipases produzidas pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01.

MATERIAL E MÉTODOS

A torta de soja, utilizada na produção de lipases, foi doada pela Imcopa (Cambé-PR, Brasil).

O carvão ativado proveniente de resíduos de jeans, utilizado para imobilizar as enzimas, foi gentilmente doado pela Prof^a Dr^a Tais Larissa da Silva.

Foi utilizado neste trabalho o micro-organismo *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) que foi mantido em BDA inclinado a $4,0 \pm 2$ °C. As cepas foram repicadas trimestralmente e transferidas do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar). As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por 5 dias.

Logo após do crescimento, foram cortadas esferas de 0,7 cm de diâmetro e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio otimizado por Andrade et al. (2013) composto por 2,37% (m/v) torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA, completando-se o volume com água destilada. O inóculo permaneceu durante 5 dias em shaker (180 rpm) a 28 °C e os frascos foram interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min) e o sobrenadante (extrato bruto) recuperado. O extrato bruto foi parcialmente purificado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20%, m/v) e novamente levado a centrifugação (5000 rpm/15 min), resultando em um precipitado rico em lipases, que foi dialisado com água deionizada para retirada do sal e armazenados a 4 °C até utilização.

Para a síntese de Fe_3O_4 foi adaptado a metodologia de García-Peña et al. (2015) na síntese de NPs de rutênio. A proporção utilizada foi de 1:7 (m/m) de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e borohidreto de sódio (NaBH_4), sendo a massa de carvão a mesma do sal de ferro. O cloreto férrico hexahidratado e o borohidreto de sódio foram macerados por cerca de 5 minutos em um almofariz de ágata, adaptado, até se tornar uma mistura homogênea em forma de pó cinza escuro, e para as NPMC foi adicionado o carvão proveniente de jeans. A mistura foi lavada com água destilada e centrifugadas (4000 rpm/5 minutos) até pH ideal. O material obtido foi centrifugado a vácuo durante 15 minutos, lavados com hexano e armazenados.

A imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em carvão, NPM e NPMC foi realizada deixando-se em contato 100 mg do material com 5 mL de enzima (10,0 U/mL) a 150 rpm e 15 °C por 195 minutos. Após o término do tempo, o imobilizado foi seco a vácuo, lavado duas vezes com tampão fosfato 0,2 M (pH 8), água destilada e hexano. A atividade enzimática foi determinada na solução de entrada e no imobilizado.

A atividade de lipase foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) como substrato, em pH 8,0, 55 °C, 2 min e 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por min, por mL da solução de enzima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com a produção de lipases em condição previamente otimizada antes e após o tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e também após a diálise contra água deionizada.

Tabela 1 – Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 antes e após concentração e diálise

Amostra	U/mL
Extrato bruto	33,3 ± 0,27
Lipase após concentração	302 ± 20,9
Lipase após concentração e diálise	322 ± 8,90

Fonte: Próprio autor (2019).

O resultado do extrato bruto obtido (33,3 U/mL) não foi satisfatório, levando em conta o valor predito apontado pelo modelo para esta condição que é de 72 U/mL (ANDRADE et al., 2013). Entretanto, após concentração com 20 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumentou quase 10 vezes esse valor, resultando em uma atividade de 322 U/mL após a diálise, demonstrando que o processo de concentração foi eficiente.

A partir da lipase concentrada foi produzida uma solução (10 U/mL) em tampão fosfato 0,05 M pH 8 que foi utilizada para imobilização nos suportes com as nanopartículas magnéticas.

Os suportes de imobilização foram produzidos a partir de NPM e NPMC. A Figura 1 ilustra o resultado da aplicação de um campo magnético sobre as NPM, demonstrando que Fe_3O_4 foi sintetizado.

Figura 1 – Aplicação de um campo magnético nas nanopartículas produzidas



Fonte: Próprio autor (2019).

Os resultados da imobilização de lipase nestes suportes estão na Tabela 2, assim como os resultados de imobilização em carvão ativado. Pode-se observar que a enzima imobilizada em carvão ativado alcançou uma atividade de $101 \pm 13,0 \text{ U/g}_{\text{suporte}}$. Quando esta enzima foi imobilizada em NPMC promoveu aumento de 239 % em sua atividade enzimática ($241,3 \pm 26,6 \text{ U/g}_{\text{suporte}}$).

Tabela 2 – Imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 nos suportes produzidos

Suporte	$\text{U/g}_{\text{suporte}}$
Carvão ativado	$101 \pm 13,0$
NPM	$80,8 \pm 7,74$
NPMC	$241,3 \pm 26,6$

Fonte: Autoria própria (2019).

A imobilização de enzimas em NPM geralmente se dá através de ligação covalente pela ativação do material com, por exemplo, glutaraldeído (VAGHARI et al., 2016). Neste trabalho foi utilizado o método de adsorção e carvão proveniente de resíduo de jeans que é um material poroso (SILVA et al., 2018) sem adição de qualquer agente de ativação e o material foi capaz de incorporar não só as partículas magnéticas, como também as moléculas de enzima.

CONCLUSÕES

As nanopartículas foram sintetizadas de forma eficiente comprovada pela aplicação de um campo magnético. A imobilização de lipases no material produzido a partir de carvão impregnado de Fe_3O_4 promoveu alta atividade

enzimática. Este material é promissor para ser aplicado na reação de hidroesterificação para a síntese de ésteres de biodiesel.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0309-9>. Acesso em: 05 jul. 2019.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022995001255?via%3DiHub>. Acesso em: 05 jul. 2019.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000400017&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 05 jul. 2019.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905004606>. Acesso em: 05 jul. 2019.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N. e BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources, **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 45, n. 6-7, p. 426, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.013>. Acesso em 08 ago. 2019.

PASHANGEH, K.H.; AKHOND, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; ABSALAN, G. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 300-307, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28711611>. Acesso em: 08 jul. 2019.

SHARMA, R.; CHRISTEI, Y. e BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases, **Biotechnology Advances**, vol. 19, p. 627, 2001. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975001000866?via%3Dihub>. Acesso em 10 jul. 2019.

SILVA, T. L.; CAZETTA, A. L.; SOUZA, P. S.C.; ZHANG, T.; ASEFA, T.; ALMEIDA, V. C. Mesoporous activated carbon fibers synthesized from denim fabric waste: Efficient adsorbents for removal of textile dye from aqueous solutions. **Journal of Cleaner Production**, v. 171, p. 482-490. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652617323259>. Acesso em: 04 jul. 2019.

VAGHARI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; MOHAMMADLOU, M.; BERENJIAN, A.; ANARJAN, N.; JAFARI, N.; NASIRI, S. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnological Letters**, v. 38, p. 223–233, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10529-015-1977-z>.

Acesso em: 14 ago. 2019.