

## Imobilização de lipases

### Lipase immobilization

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi imobilizar lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em sílica mesoporosa por adsorção física e analisar a eficiência de imobilização (E) e a retenção da atividade (R). A dosagem das atividades enzimáticas antes e após a imobilização foi realizada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). A eficiência de imobilização foi de 73% e a retenção de atividade de 170%.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sílica Mesoporosa. Imobilização. Lipase.

#### ABSTRACT

The objective of this work was to immobilize lipases from *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 in mesoporous silica by physical adsorption and to analyze the immobilization efficiency (E) and activity retention (R). The measurement of enzymatic activities before and after immobilization was performed by hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP). The immobilization efficiency was 73% and the retention of activity was 170%.

**KEYWORDS:** Mesoporous Silica. Immobilization. Lipase.

**Talita Lamparelli**  
[talitalamaprelli@alunos.utfpr.edu.br](mailto:talitalamaprelli@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica do  
Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Alessandra Machado Baron**  
[alessandrab@utfpr.edu.br](mailto:alessandrab@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica do  
Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Valeria Marta Gomes do  
Nascimento**  
[valeria.nascimento@unesp.br](mailto:valeria.nascimento@unesp.br)  
Universidade Tecnológica do  
Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Patrícia Salomão Garcia**  
[patriciagarcia@utfpr.edu.br](mailto:patriciagarcia@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica do  
Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Alesandro Bail**  
[alebail@utfpr.edu.br](mailto:alebail@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica do  
Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

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



## INTRODUÇÃO

Estudos sobre enzimas hidrolíticas estão ganhando um espaço cada vez maior na literatura científica devido sua versatilidade frente a muitos substratos e a sua utilização, tornando-as também um destaque no meio comercial. Dentre as enzimas hidrolíticas, as lipases de *Pseudomonas* (gênero empregado neste trabalho) atuam principalmente em reações para formação e hidrólise de ésteres aplicados na indústria de alimentos, cosméticas e farmacêuticas (MACARIO et al., 2002; ALI et al., 2016; RIOS et al., 2018).

Para que estas reações ocorram da maneira mais eficaz, é preciso que o biocatalisador seja estável e mantenha a eficiência catalítica nos diversos meios reacionais. Dessa forma, a imobilização é uma alternativa para alcançar tais características (CARVALHO et al., 2015; ALI et al., 2016; RIOS et al., 2018).

A imobilização enzimática é realizada por meio de técnicas, podendo ser por adsorção física ou por outros métodos químicos, como ligação covalente e encapsulamento. O processo adotado neste trabalho foi a adsorção física, pois além de possuir baixo custo, também é mais simples se comparado com os demais. Apesar de o método proporcionar elevada estabilidade à enzima, a maior desvantagem está relacionada à possibilidade de dessorção da enzima do suporte e consequência dissolução da enzima no meio reacional (CARVALHO et al., 2015; ALI et al. 2016; RIOS et al., 2018).

A imobilização de enzimas pode apresentar algumas vantagens se comparada com a enzima livre, tais como maior estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, maior atividade catalítica, contribui na separação dos produtos e até mesmo viabilizaria o contato enzima e substrato. Além disso, a imobilização tem capacidade de regenerar o biocatalisador, através de uma simples filtração, para poder ser reutilizado em outras reações (ALI et al., 2016; RIOS et al., 2018).

Entre os vários tipos de suporte para imobilização de enzimas, a sílica mesoporosa é um material particularmente atraente para tal finalidade, pois possui uma estrutura ordenada, distribuição de tamanho de poros estreito e uma grande área de superficial, é quimicamente e mecanicamente estável e resistente ao ataque microbiano e pode ser quimicamente modificada com vários grupos funcionais (HARTMANN et al., 2013; MAGNER et al., 2013).

Dentro deste contexto, este trabalho contribuiu com os estudos de imobilização de lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em sílica mesoporosa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, utilizadas neste trabalho, foram isoladas no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis. A bactéria é oriunda de uma contaminação da cultura fúngica e identificada por métodos morfológicos e moleculares (16S rRNA) na Fundação André Tosello (FAT). A produção de lipases,

por fermentação submersa, foi realizada pela professora Dra Valéria Marta Gomes do Nascimento e gentilmente cedida para o grupo Biopase (UTFPR-AP) para estudos de imobilização e aplicação em biocatálise.

Em estudos anteriores (OILIVEIRA 2017), as lipases de *B. lata* LBBIO-BL02 apresentaram características desejáveis para a imobilização e aplicação de enzimas em biocatálise. Por exemplo, apresentaram atividade máxima na temperatura de 55 °C e se mantiveram relativamente estáveis a 60 °C, mantendo 60% de sua atividade inicial após 1 h de incubação. Mantiveram 100% de sua atividade inicial quando incubadas em tolueno, *n*-hexano e *n*-heptano (1 h, 25 °C). Em solventes hidrofílicos, como metanol, etanol e isopropanol em uma razão de 50% (v/v), as enzimas apresentaram 78%, 76% e 90% de estabilidade respectivamente (1 h, 25 °C). Quanto a estabilidade das enzimas frente a variações de pH, foram estáveis para variações de pH na faixa de 4 a 9, mantendo 100% de sua atividade inicial (1 h, 25 °C). Além disso, as enzimas foram imobilizadas, até o momento, somente em Celite, o que justificaria a continuidade dos estudos relacionados à utilização de novos suportes para imobilização das lipases de *B. lata* LBBIO-BL02.

O suporte utilizado para a imobilização foi uma sílica mesoporosa (SMP) com área específica de aproximadamente 320 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, cedida pelo professor Dr Alesandro Bail (UTFPR-AP). A imobilização ocorreu pelo processo de adsorção. Inicialmente o suporte (1 g) foi lavado com porções de 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 (0,05 mol L<sup>-1</sup>) até pH constante. Após 30 min, o suporte foi filtrado e armazenado em dessecador à vácuo (25 °C, 16 h).

Para a imobilização, 50 mg do suporte e 10 mL de solução enzimática (3 mg de proteína para 0,1 g de suporte), foram colocados em um erlenmeyer (25 mL) e agitados a 100 rpm (25 °C) por 6 h. O suporte foi separado por centrifugação (300 rpm, 5 min), lavado com 2 mL de tampão (pH 7, 0,05 mol L<sup>-1</sup>), seco em dessecador a vácuo por 12 h e armazenado a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido para dosagem da atividade lipolítica residual. O suporte contendo a enzima foi transferido para um dessecador à vácuo (4 °C, 16 h). Após, foi armazenado à 4 °C.

A atividade enzimática (antes e após a imobilização) foi determinada pelo método de Winkler e Stuckmann (1979).

A partir dos resultados experimentais, foram calculados os parâmetros do processo de imobilização E (Eficiência da imobilização) e R (Retenção da atividade), utilizando as Equações 1 e 2 respectivamente (YADAV; JADHAV, 2005):

$$E = \frac{(At_i - At_f) \cdot 100}{At_i} \quad (1)$$

$$R = \frac{A_o \cdot 100}{A_r} \quad (2)$$

Sendo: At<sub>i</sub>: atividade inicial total de hidrólise frente ao pNPP, antes da imobilização (U); At<sub>f</sub>: atividade final total de hidrólise frente ao pNPP no

sobrenadante após a imobilização ( $U$ );  $A_0$ : atividade observada (real) da enzima imobilizada ( $U\ g^{-1}$  do suporte);  $A_T$ : atividade teórica da enzima imobilizada ( $U\ g^{-1}$  do suporte);  $U$ : unidades totais de atividade ( $\mu\text{mols do produto min}^{-1}$ ).

Para o cálculo da eficiência ( $E$ ), considerou-se atividade inicial e final do sobrenadante. Para os cálculos de retenção da atividade ( $R$ ), considerou-se a atividade da enzima imobilizada frente à reação de hidrólise do  $p\text{NPP}$  em meio aquoso. As reações foram feitas em triplicata.

Para a dosagem da atividade da solução enzimática antes e após a imobilização a 1 mL da solução A (3 mg de  $p\text{NPP}$  por mL de isopropanol) foram misturados 9 mL da solução B (2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato  $0,05\ \text{mol L}^{-1}$  pH 7,0), lentamente e sob contínua agitação. A mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 0,9 mL em cubeta. Estabilizada na temperatura a  $55\ ^\circ\text{C}$ , foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou de tampão, quando se preparou o branco. A reação foi feita em cubeta com capacidade de 1,0 mL e a leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a  $55\ ^\circ\text{C}$  e pH 7,0. A cinética da reação foi acompanhada por UV-vis pela leitura das absorbâncias (410 nm) a cada 20 s durante o tempo de 1 min.

A dosagem da atividade da enzima imobilizada foram realizadas em banho de ultrassom a  $55\ ^\circ\text{C}$ , em erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL de meio reacional (A+B) e iniciada com a adição de 1 mg de enzima imobilizada. A cinética das reações foi seguida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min), transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 410 nm. As dosagens foram feitas em duplicata.

A atividade enzimática (tanto para o sobrenadante quanto para a enzima imobilizada) foi calculada utilizando a Equação 3, sendo uma unidade de atividade enzimática ( $U$ ) definida como a liberação de  $1\ \mu\text{mol}$  de  $p$ -nitrofenol ( $p\text{NP}$ ) por minuto. O coeficiente de extinção molar do  $p\text{NPP}$ , em pH 7,0, ( $8,3 \cdot 10^3\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\varepsilon \cdot X_{enz}} \quad (3)$$

Sendo:  $C_{ang}$ : o coeficiente anular da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos); 60: a transformação de segundos para minutos; ND: fator de diluição;  $\varepsilon$ : coeficiente de extinção molar do  $p\text{NPP}$  a pH 7,0;  $X_{ENZ}$ : Volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (em mg).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A imobilização enzimática foi avaliada através da eficiência de imobilização ( $E$ ) e a retenção da atividade ( $R$ ) em meio aquoso (método da hidrólise do  $p\text{NPP}$ ).

Estes parâmetros são importantes, pois indicam a quantidade de enzima que foi adsorvida no suporte e quanto da enzima está ativa depois do procedimento de imobilização. A eficiência de imobilização foi de 73% e a retenção foi de 170%.

A retenção da atividade indica quanto da enzima está ativa no suporte após o processo de imobilização em comparação com a enzima livre. Os valores de retenção são dependentes da imobilização, do suporte e do meio reacional. Retenções distintas de 100% indicam a ocorrência de modificações estruturais na enzima favoráveis ou não à catálise, após a imobilização. No caso deste trabalho, o valor da retenção (170%) indica que durante a imobilização, a enzima sofreu ativação interfacial, ou seja, as mudanças conformacionais foram favoráveis à catálise.

Utilizando de estudos relacionados à outras sílicas mesoporosas empregadas como suportes para imobilização de lipases, observa-se diferentes tipos de lipases e as técnicas de imobilizações do tipo ligação covalente e adsorção (Quadro 1).

Quadro 1 – Principais resultados utilizando sílicas mesoporosa para imobilização de Lipases.

Suporte	Lipase/ Imobilização	Tipo de reação	Principais Resultados	Referência
Sílica Mesoporosa Amorfa	<i>Pancreática</i> (PPL) Adsorção	Reação de Hidrólise de triacetina	pH ótimo para PPL imobilizada (8,0) e livre (7,0); Temperatura ótima para PPL imobilizada (45 °C), e livre (35 °C)	(WANG et al., 2011)
Sílica Mesoporosa Amino-funcionalizada	<i>Pancreática</i> (PPL) Adsorção	Reação de Hidrólise da triacetina e Reação de esterificação do ácido caprílico com álcool caprílico.	Maior estabilidade ao pH e à temperatura em relação à enzima livre 67,47% em éster para NH-MS-PPL ~20% em éster para a PPL (livre)	(WANG et al., 2012)
Nanopartícula de sílica mesoporosa funcionalizada	<i>Candida rugosa</i> (CRL) Ligação Covalente	Hidrólise do óleo de oliva	Foi mais estável que a enzima livre para os estudos de estabilidade em pH (7,5 e 8,0) e termoestabilidade a 50 °C	(ALI et al., 2016)
Sílica Mesoporosa	<i>Burkholderia lata</i> Adsorção	Reação de Hidrólise	E (eficiência de imobilização) 73% R (retenção) 170% (pNPP)	Este trabalho (2020)

Fonte: Autoria própria (2020).

Por exemplo, Wang et al. (2011) sintetizaram uma sílica mesoporosa amorfa para aplicar como suporte na imobilização (adsorção) da PPL. Os resultados mostraram que a enzima imobilizada apresentou pH e temperatura ótimos

superiores à enzima livre. Além disso, a atividade relativa da PPL imobilizada reteve cerca de 45% da atividade catalítica inicial após incubação a 60 °C por 2 h, enquanto PPL livre permaneceu apenas cerca de 20%, ou seja a termoestabilidade aumentou após a imobilização. A enzima imobilizada foi reutilizada em reações de hidrólise da treacetina e após 6 reusos, apresentou cerca de 45% da atividade relativa inicial.

Wang et al. (2012) prepararam uma sílica mesoporosa funcionalizada e empregaram o material para imobilizar lipases de PPL (NH-MS-PPL). Os estudos compararam a eficiência catalítica da lipase imobilizada na mesma sílica não funcionalizada (MS-PPL). A atividade de hidrólise da treacetina da lipase imobilizada em NH-MS foi quase o dobro da MS. O PPL imobilizada em NH-MS apresentou maior atividade relativa nas reutilizações para as reações de hidrólise. Além disso, a esterificação utilizando ácido e álcool caprílico também foi investigada e a taxa de conversão foi de 67,47%, 58,75% e 20% em éster para a PPL imobilizada em sílica funcionalizada, funcionalizada e livre (sem imobilização) respectivamente.

Ali et al. (2016), imobilizaram por ligação covalente, lipases de *Candida rugosa* (CRL) em fibras de nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com grupos aminos. A Lipase imobilizada manteve acima de 81% a atividade inicial após 28 dias e 80% de atividade residual após 8 ciclos repetidos (hidrólise do óleo de oliva). Foi mais estável que a enzima livre para os estudos de estabilidade em pH (7,5 e 8,0) e termoestabilidade a 50 C.

Apesar não de haver possibilidade de comparação dos resultados deste trabalho com os reportados no Quadro 1, pois as reações e parâmetros estudados são distintos ao estudados neste projeto, destaca-se que a imobilização de lipases em suportes como sílicas podem melhorar a eficiência catalítica destas enzimas, além de possibilitar a reutilização em alguns casos.

## CONCLUSÃO

Através desse trabalho pode-se concluir que a imobilização da lipase de *B. lata* apresentou alta eficiência de imobilização (73%) e ativação após o processo, pois a retenção foi superior a 100% o que justifica a continuidade dos estudos utilizando este suporte.

## AGRADECIMENTOS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

## REFERÊNCIAS

ALI, Z.; LEI, T.; PANPAN, Z.; BAOLIANG, Z.; ALI, N.; MUHAMMAD, K.; QIUYU, Z. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, Parte A, p. 129-135, 2016.

HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas—Benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6277-6289, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2014.

MACARIO, A.; CALABRÒ, V.; CURCIO, S.; PAOLA, M.; GIORDANO, G.; LORIO, G.; KATOVIĆ, A. Preparation of mesoporous materials as a support for the immobilisation of lipase. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 142, p. 1561-1568, 2002.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6213-6222, 2013.

OLIVEIRA, B. H. **Produção e purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, sua caracterização cinética e aplicação em reações de biocatálise de interesse farmacológico e industrial**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150568>. Acesso em 03/09/2020.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

WANG, X.; ZHOU, Z.; ZHANG, H.; DU, S.; XU, Y.; WANG, C. Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, p. 3027-3032, 2011.

WANG, C. F.; ZHOU, G. W.; LI, Y. J.; LU, N.; SONG, H. B.; ZHANG, L. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 406, p. 75-83, 11, 2012.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, EUA, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215-222, 2005.