



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

# ESTUDO DO EFEITO DO pH E DA PRESENÇA DE DETERGENTE NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* (TLL) EM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS

R. M. BEZERRA<sup>1</sup>, J. C. S. DOS SANTOS<sup>2</sup>, D. M. ANDRADE NETO<sup>3</sup>, W. S. GALVÃO<sup>3</sup>, P. B. A. FECHINE<sup>3</sup>, L. R. B. GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup>Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Físico-Química e Química Analítica

E-mail para contato: rayannemb12@gmail.com

**RESUMO** – A Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foi imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas (NPM) de ferro ( $Fe_3O_4$ ) para melhorar a estabilidade deste biocatalisador e facilitar a recuperação do mesmo por aplicação de campo magnético. As NPM utilizadas apresentam modificações em suas superfícies dadas pelo recobrimento com  $\gamma$ -aminopropiltrióxissilano (APTES) ou com polietilenimina ramificada (BPEI), o que melhora a interação das enzimas com o suporte. No processo de imobilização a presença de detergente Triton-X e o pH do meio foram avaliados. As imobilizações se deram por formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte à 25°C, com tampões de concentração de 25mM. Os biocatalisadores produzidos com NPM@BPEI e NPM@APTES apresentaram atividade de 8,9 U $\rho$ -NPB e 10,9 U $\rho$ -NPB por grama de suporte respectivamente, na presença do detergente com concentração de 0,1%(v/v), pH 7 e 25mM.

## 1. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de origem biológica com um alto potencial em diferentes áreas de aplicação da indústria, devido a sua alta seletividade, especificidade e atividade em condições brandas (BRÍGIDA, 2010). Atualmente, as lipases são enzimas entre as mais utilizadas na biocatálise devido ao seu baixo custo, à sua grande disponibilidade, à sua ampla especificidade acoplada em certos casos, a uma alta seletividade enantiométrica (RUEDA et al., 2015a).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* tem sido bastante utilizada em estudos científicos graças à sua ampla utilização em diferentes reações, como hidrólise de ésteres e transesterificações (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015b; GARCIA-GALAN et al., 2014; MENDES et al., 2011; RUEDA et al., 2015b, 2015c), além de apresenta uma alta estabilidade a uma ampla faixa de pH (entre 7 e 10), e possuir um potencial de uso na indústria de detergentes e farmacêutica (BRÍGIDA, 2010). Esta lipase apresenta uma grande tampa única, capaz de evitar completamente a interação do centro ativo da

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

enzima com meio (RUEDA et al., 2015c). Devido a esta tampa, métodos de ativação da enzima são necessários para melhorar a sua atividade catalítica, como por exemplo, a adição de um surfactante à etapa de imobilização, pois ele possibilita a abertura dessa tampa graças ao seu caráter anfótero.

Conhecendo o mecanismo de ação de lipases, considerou-se variáveis que podem favorecer ou não a exposição do sítio ativo presente em uma espécie de bolsa hidrofóbica. Isso pode afetar a atuação de lipases imobilizadas em suportes. À primeira vista, uma grande resistência iônica deve desfavorecer a exposição da grande bolsa hidrofóbica, enquanto a presença de detergentes podem estabilizá-la (DOS SANTOS et al., 2015a).

As enzimas podem ser imobilizadas covalentemente ou por interação iônica às nanopartículas superparamagnéticas (NSPM) funcionalizadas (XIE; MA, 2009). Essas nanopartículas podem ser separadas do meio reacional por decantação magnética ou em reatores de leito fluidizado magneticamente estabilizados. Elas consistem de um óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestido com, por exemplo, sílica que contém extremidades amina ou carboxílica. Esse revestimento pode ser utilizado para ligar a enzima às NSPM e garantir uma maior estabilidade física a essas nanopartículas (SHELDON; VAN PELT, 2013). O termo superparamagnetismo foi introduzido por Bean e Livingstonem 1959 para descrever o comportamento magnético de partículas magnéticas de dimensões em escala manométrica (GALVÃO, 2014; NETO, 2015).

Modificações foram realizadas na superfície das nanopartículas com os polímeros 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e polietilenimina ramificada (BPEI) para proteger as NSPM e possibilitar a ligação das enzimas ao suporte. A estratégia de imobilização escolhida neste trabalho foi por ligação covalente da lipase de TLL nos suportes superparamagnéticos: nanopartículas de ferro revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano (@APTES) e nanopartículas de ferro revestidas com polietilenimina ramificada (@BPEI).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

O extrato comercial da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (15,83 mg/mL) foi obtida a partir da Novozymes (Espanha). Os suportes NPM@APTES e NPM@BPEI foram cedidos pelo grupo de Química de Materiais avançados (GQMat) do Departamento de Físico-Química e Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, UFC. O substrato  $\rho$ -Nitrofenil Butirato ( $\rho$ NPB) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.2 Métodos

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média destes valores e com desvio padrão (geralmente abaixo de 10%).

Preparação das NSPM: As nanopartículas foram sintetizadas pelo método da co-precipitação,

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

assistida por aquecimento de micro-ondas. Os difratogramas das amostras confirmaram a formação das nanopartículas, que apresentaram estrutura cúbica do tipo espinel inverso e boa cristalinidade. Foram obtidos valores de magnetização remanescente e coercividade igual à zero, sugerindo comportamento superparamagnético (GALVÃO, 2014).

Recobrimento do suporte com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES): A amostra de magnetita sofreu modificação de sua superfície pelo polímero APTES (3-aminopropiltriétoxissilano), utilizando o aquecimento por micro-ondas. Realizou-se uma etapa de ultrassom na adsorção da magnetita, a fim de se estudar a influência dessa técnica na eficiência do processo de adsorção do APTES. Os dados obtidos da análise de Infravermelho (FT-IR), confirmaram a adsorção desse polímero às NSPM (GALVÃO, 2014).

Recobrimento do suporte com polietilenimina ramificada (BPEI): A coprecipitação assistida por  $\text{NH}_4\text{OH}$  e a funcionalização por BPEI foram feitas em uma só etapa. A estrutura das NSPM obtidas após o recobrimento com BPEI foi avaliada por meio de Difração de Raio-X (DRX). A presença de grupos funcionais na superfície das NSPM foi confirmada por FT-IR (NETO, 2015).

Ativação do suporte com glutaraldeído: A ativação das NSPM (0,01g) foi realizada com glutaraldeído em solução de 25% (m/v) na proporção de 2,5 mL de solução por grama de suporte. A mistura foi mantida sob agitação (45 rpm) por 2 horas à temperatura ambiente (25°C). Finalmente o suporte foi lavado com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 para remover o excesso de agente ativador, baseado na metodologia utilizada por (SOUZA, 2013). A função do glutaraldeído é reagir com os grupos amins dos revestimentos (APTES e BPEI), formando uma ligação imina e deixando um terminal aldeído para reagir com os resíduos de aminoácidos da enzima (SOUZA, 2013).

Imobilização enzimática: A lipase de TLL solúvel foi imobilizada em NSPM revestidas por APTES e em NSPM revestidas por BPEI. Na imobilização do tipo covalente multipontual, o suporte foi reticulado com glutaraldeído antes de entrar em contato com as enzimas (SOUZA, 2013). O processo de imobilização foi realizado pelo contato de 0,01 g de nanopartículas superparamagnéticas com 1,0 mL de solução enzimática em tampão de fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A imobilização ocorreu em reator batelada sob agitação orbital por até 24 h e à 25°C, baseado na metodologia apresentada por (SILVA et al., 2012). Comparou-se a atividade da enzima livre com a atividade do sobrenadante para poder calcular o rendimento de imobilização.

Imobilização enzimática na presença de detergente: Na imobilização do tipo covalente multipontual na presença de detergente, o suporte foi reticulado com glutaraldeído antes de entrar em contato com as enzimas (SOUZA, 2013). Depois, a imobilização foi realizada pelo contato de 0,01 g de nanopartículas superparamagnéticas com 1,0 mL de solução enzimática em tampão de fosfato de sódio (25 mM e pH 7,0 à 25°C) com detergente Triton-X à 0,01% (v/v). Os resultados foram comparados aos obtidos sem a presença desse aditivo (BRÍGIDA, 2010).

Imobilização em diferentes pHs: O processo de imobilização foi realizado pelo contato de 0,01 g de nanopartículas superparamagnéticas com 1,0 mL de solução enzimática em meios de diferentes pHs. Os tampões utilizados como meio de imobilização foram: citrato (pH 5,0), fosfato de sódio (pH

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



7,0) e bicarbonato de sódio (pH 10,0), todos à 25mM e à 25°C. A imobilização ocorreu em reator batelada sob agitação orbital por até 24 h e à 25°C, baseado na metodologia apresentada por (SILVA et al., 2012). As imobilizações foram do tipo covalente em NSPM@APTES.

Atividade catalítica da enzima livre e imobilizada: A atividade hidrolítica da lipase de TLL foi medida a partir da hidrólise do  $\rho$ -Nitrofenil Butirato ( $\rho$ NPB), na concentração de 50 mM. O produto da hidrólise do  $\rho$ NPB foi quantificado por um espectrofotômetro com comprimento de onda de 400 nm (RUEDA et al., 2015a). Na determinação da atividade da enzima livre utilizou-se 50  $\mu$ L de solução enzimática de concentração conhecida (solução de enzima e tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0), 2,5 mL da solução de tampão fosfato de sódio a pH 7,0 e 25 mM à 25°C e 50  $\mu$ L do substrato. Observou-se a quantidade de produto formado em 90 segundos segundo a metodologia descrita por (RIOS, 2013). Na determinação da atividade da lipase imobilizada, utilizou-se 0,5 mL de  $\rho$ NPB em contato com 10 mg do derivado em 25,5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,0, 25 mM. O sistema foi mantido sob agitação mecânica durante pelo menos 15 minutos de acordo com a metodologia descrita por (RIOS, 2013), com modificações. Realizou-se medidas pontuais do aumento da absorvância da solução durante o tempo de reação, de forma regular. Os cálculos de atividade da enzima livre e imobilizada foram realizados de acordo com (BRÍGIDA, 2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Influências da presença de detergente

Visando uma imobilização por ligação covalente mais eficiente, analisou-se a influência do detergente Triton-X (0,1% v/v) na imobilização enzimática. A presença deste aditivo não possibilitou uma eficiente ligação da enzima ao suporte, para ambas as amostras (TABELA 1). A carga oferecida para esse ensaio foi de 5 mg de proteína por grama de suporte, para cada amostra. As imobilizações ocorreram em meio neutro (tampão fosfato de sódio pH 7,0, 25mM), à temperatura ambiente (25°C), sob agitação constante (45 rpm).

Tabela 1 - Análise da influência do detergente Triton-X na imobilização covalente da lipase de TLL em NSPM@APTES e em NSPM@BPEI, em meio neutro, à temperatura ambiente e sob agitação constante

Triton-X (0,1% v/v)	Atividade do derivado (U/g)	
	APTES	BPEI
Com detergente	8,9 $\pm$ 0,99	10,9 $\pm$ 1,3
Sem detergente	135,2 $\pm$ 10,4	12,9 $\pm$ 1,6

O efeito da força iônica sobre a taxa de imobilização em CNBr foi analisado no trabalho (DOS SANTOS et al., 2015a). A utilização de 0,01% de detergente (CTAB) produziu um aumento significativo na taxa de inibição de CNBr-TLL, sugerindo que a forma aberta da enzima pode ser agora estabilizada. Isso não ocorreu no ensaio de imobilização realizado na presença de Triton-X (0,1% v/v) para este trabalho.

Acredita-se que a perda em atividade dos derivados, principalmente para o suporte NSPM@APTES, deu-se devido à elevada concentração do surfactante, o que provavelmente causou a desnaturação das enzimas presentes no meio de imobilização. Não houve grande diferença entre os valores encontrados para as imobilizações feitas sobre as NSPM@BPEI, com ou sem detergente, pois as enzimas sofrem uma distorção espacial quando imobilizadas covalentemente sobre esse suporte devido à presença de amins primárias, secundárias e terciárias na superfície das NSPM@BPEI. Essa distorção compromete a estrutura das enzimas imobilizadas, causando inativação.

### 3.2 Efeito do pH

A carga oferecida para esse ensaio foi de 8 mg de proteína por grama de suporte, para cada amostra. O melhor rendimento de imobilização foi obtido no meio alcalino (pH 10) para 24 horas de contato (TABELA 2). Entretanto, a melhor estabilidade de imobilização foi obtida no meio de pH neutro a partir de três horas de contato (FIGURA 3).

Dado que a lipase de TLL é classificada como uma lipase alcalina, sua atividade é baixa em meios ácidos, o que explica a baixa atividade do derivado da imobilização realizada em tampão citrato pH 5,0 e 25 mM à 25°C. O derivado obtido da imobilização realizada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 e 25 mM apresentou uma melhor estabilidade operacional quando utilizado em análises subsequentes e teve um maior rendimento de imobilização em um menor tempo quando comparado com o derivado da imobilização realizada em tampão bicarbonato de sódio pH 10,0 e 25 mM. O maior rendimento de imobilização à pH 10,0 obtido após 21 horas, deve-se, provavelmente, à adsorção enzimática favorecida pelo pH do meio.

Tabela 2 - Rendimento de imobilização e valores de atividade inicial e final após 24 horas de imobilização por ligação covalente da lipase de TLL em NSPM@APTES em diferentes pH

<i>pH</i>	<i>At<sub>I</sub> (U/g)</i>	<i>desvP (At<sub>I</sub>)</i>	<i>At<sub>F</sub> (U/g)</i>	<i>desvP (At<sub>F</sub>)</i>	<i>RI (%)</i>
5	265,3365931	2,436709	225,5516672	6,654386	14,99413
7	508,3755179	6,11939	156,5364224	5,077984	69,2085
10	336,7570432	4,511606	74,92922027	2,916878	77,19208

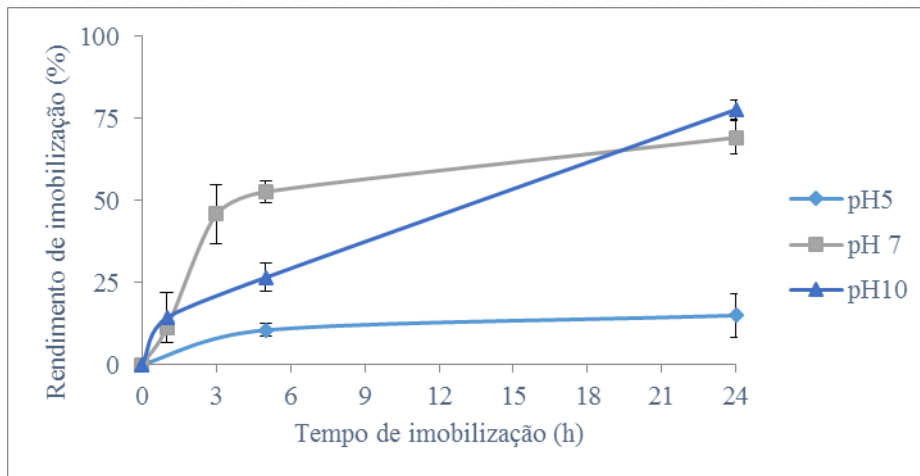


Figura 3 - Efeito do pH na imobilização por ligação covalente da lipase de TLL em NSPM@APTES

## 4. CONCLUSÃO

A modificação das nanopartículas superparamagnéticas de ferro por polímeros (APTES e BPEI) garantiu a proteção das NSPM e uma melhor interação entre o suporte e a enzima. Esses revestimentos também permitiram a interação das NSPM com os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído.

O tipo de surfactante estudado e a sua elevada concentração contribuíram para a desnaturação das enzimas presentes no meio de imobilização, causando a perda em atividade dos derivados. A superfície ramificada das NSPM@BPEI também prejudicou a atividade catalítica da enzima imobilizada por ligação covalente, devido aos grupos amins primárias, secundárias e terciárias presentes. Essas ramificações causam inativação da enzima por deformação da estrutura da proteína quando a imobilização se dar pela formação de ligações covalentes.

As imobilizações da lipase de TLL nas NSPM foram mais eficazes em meio neutro (tampão fosfato pH 7,0, 25mM) à temperatura ambiente e sob agitação constante. A melhor condição catalítica foi obtida entre 3 e 5 horas de imobilização, à 25°C e pH neutro. A estabilidade operacional apresentada mostra a potencial aplicação da TLL imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas como biocatalisador heterogêneo em substituição a catalisadores químicos. Além disso, a fácil separação e recuperação do biocatalisador por simples aplicação de campo magnético é de grande valor na recuperação da enzima e na diminuição de poluentes.



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

## 5. REFERÊNCIAS

- BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de Lipases utilizando fibra da casca de coco verde como Suporte para Aplicações Industriais. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015a.
- DOS SANTOS, J. C. S. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. *Process Biochemistry*, v. 5, n. 45, p. in press, 2015b.
- GALVÃO, W. DOS S. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> POR SÍNTESE HIDROTÉRMICA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. *Molecules*, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014.
- MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011.
- NETO, D. M. A. Ferrofluids obtained by fast sonochemistry approach. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.
- RIOS, N. S. Avaliação de suportes nanoestruturados para a imobilização da Lipase de *Yarrowia lipolytica* visando a produção de biodiesel. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.
- RUEDA, N. et al. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Adv.*, v. 5, n. 15, p. 11212–11222, 2015a.
- RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. *Catalysis Today*, n. In press, p. 10.1016/j.cattod.2015.05.027, 2015b.
- RUEDA, N. et al. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. *RSC Advances*, v. 5, n. 68, p. 55588–55594, 2015c.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 16–24, 2012.
- SOUZA, M. C. M. DE. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *CANDIDA ANTARCTICA* DO TIPO B EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS VISANDO A APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.
- XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalys for biodiesel production. *Energy & Fuels*, v. 23, n. 17, p. 1353–1374, 2009.