

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES DE ORIGENS DISTINTAS EM SUPORTE CONSTITUÍDO POR ÓXIDO DE GRAFENO IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Anna Clara Labes Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Alexandre Diório, Ana Carla Medeiros, Danielle Faxina de Lima, Rosângela Bergamasco, Marcelo Fernandes Vieira (Orientador), e-mail: mfvieira2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia / Maringá, PR.

Área: Engenharias II; Subárea: Operações de Separação e Mistura.

Palavras-chave: lipase, imobilização, óxido de grafeno.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi suportar lipases, por adsorção, em óxido de grafeno modificado com nanopartículas magnéticas (biocatalisador). Foram analisadas cinco diferentes lipases, cujos parâmetros de imobilização foram observados em termos proteicos e em atividade, bem como a estabilidade à temperatura e ao pH. A TLL apresentou a maior atividade hidrolítica específica ($697 \text{ U mg}^{-1}_{\text{proteína}}$) e a sua imobilização em SPION-GO aumentou a estabilidade térmica em relação à enzima livre. Não foi observada melhora significativa na estabilidade ao pH. Concluiu-se que a produção do biocatalisador garantiu vantagens em relação à utilização da enzima livre, o que justifica a aplicação do método.

Introdução

Lipases são enzimas muito utilizadas como catalisadores de reações químicas, como hidrólise, esterificação e transesterificação. A atividade enzimática das lipases é específica para cada espécie da qual a enzima é proveniente, dessa forma sua eficiência catalítica pode sofrer variações e resultados diferentes em uma mesma reação podem ser obtidos ao com diferentes lipases (RODRIGUES; AYUB, 2011).

Essas enzimas são utilizadas em biotecnologia para a produção de biocombustíveis. Catalisadores enzimáticos dispersos no meio reacional não são economicamente favoráveis por possuírem natureza solúvel, o que prejudica sua separação. A imobilização enzimática em suporte sólido, entre os quais destacam-se as nanopartículas magnéticas, é uma das soluções para esse problema e garante outras vantagens como maior estabilidade em temperaturas elevadas e aumento da eficiência nas reações. (BAGI; SIMON; SZAJÁNI, 1997).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi suportar as enzimas lipases em óxido de grafeno modificado com nanopartículas superparamagnéticas obtendo, assim, um biocatalisador.

Materiais e métodos

Determinação de proteínas nas enzimas livres e imobilizadas

Foram utilizadas cinco lipases distintas: amano lipase M de *Mucor* ou *Mucor circinelloides* (LMJ); Lipolase® 100L (*Thermomyces lanuginosus* - TLL); lipase de *Rhizopus niveus* (LRN); lipase de *Candida* sp. (CALA); lipase de pâncreas de porco tipo III (LPP) adquiridas da Sigma-Aldrich. As proteínas foram quantificadas nas enzimas livres e nas imobilizadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

Imobilização enzimática por adsorção/troca iônica

A imobilização enzimática foi do tipo adsorção/troca iônica na superfície do óxido de grafeno modificado com nanopartículas superparamagnéticas (SPION-GO). O método consistiu na suspensão do suporte em tampão fosfato de sódio 5 mmol L⁻¹ pH 7,0. A suspensão foi mantida sob agitação em Shaker a 25 °C. Foi adicionada a solução enzimática de forma a obter uma concentração de 10 mg_{prot}/g_{sup}. O sistema foi mantido sob agitação por 1 h sendo retirado alíquotas do sobrenadante em intervalos regulares de tempo. Após a imobilização, o material foi lavado 3 vezes e foram retiradas alíquotas dos lavados para análise.

Resultados e Discussão

A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos acerca da quantidade de proteínas presentes nas cinco lipases analisadas.

Tabela 1 – Quantidade de proteína nas lipases utilizadas.

Qtd. de prot.	Sólidas (mg _{proteína} /g _{lipase})			Líquidas (mg _{proteína} /mL _{lipase})	
	LPP	LRN	LMJ	TLL	CALA
	197,547	145,673	143,545	6,2984	6,119

A imobilização por adsorção no suporte SPION-GO resultou nos dados expostos nos gráficos da **Figura 1**.

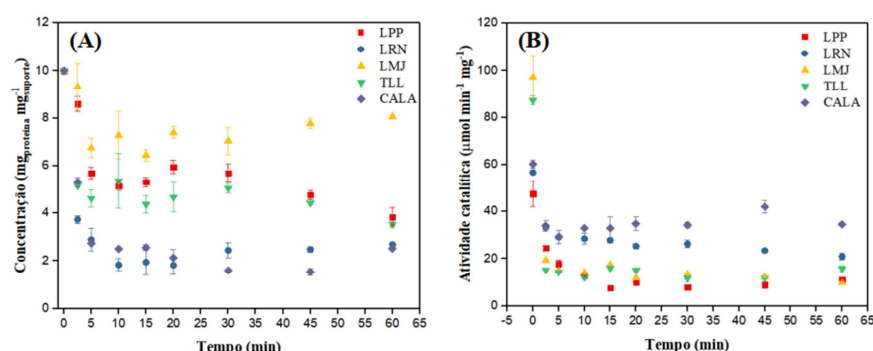


Figura 1: Adsorção de lipases em SPION-GO: em função da concentração de proteínas (A) e atividade catalítica (B).

A análise da **Figura 1 (A)** permitiu observar que a carga proteica de 10 mg/g foi suficiente para saturar os sítios disponíveis do suporte, visto que o valor nulo não foi atingido. A enzima CALA apresentou maior quantidade de

proteína imobilizada, com carga proteica residual menor que 2 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ na condição de equilíbrio. Além disso, ao analisar **Figura 1 (B)**, observou-se que a atividade catalítica da CALA foi a menor dentre as cinco enzimas. A maior atividade específica obtida foi atingida para a TLL ($697 \text{ U mg}_{\text{proteína}}^{-1}$) e a menor para a LRN ($178 \text{ U mg}_{\text{proteína}}^{-1}$). Assim, a TLL foi considerada mais adequada para imobilização por adsorção no suporte SPION-GO e passou a ser chamada de biocatalisador.

A atividade de esterificação foi determinada para a enzima livre e para o biocatalisador: $24,4 \text{ U mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ e $33,1 \text{ U mg}_{\text{proteína}}^{-1}$, respectivamente. Houve um aumento de 37% na atividade em relação à enzima livre, que expressa estabilidade e atividade catalítica do biocatalisador para as reações de hidrólise e esterificação. Os resultados da estabilidade térmica do biocatalisador e a temperatura de máxima atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada encontram-se na **Figura 2**.

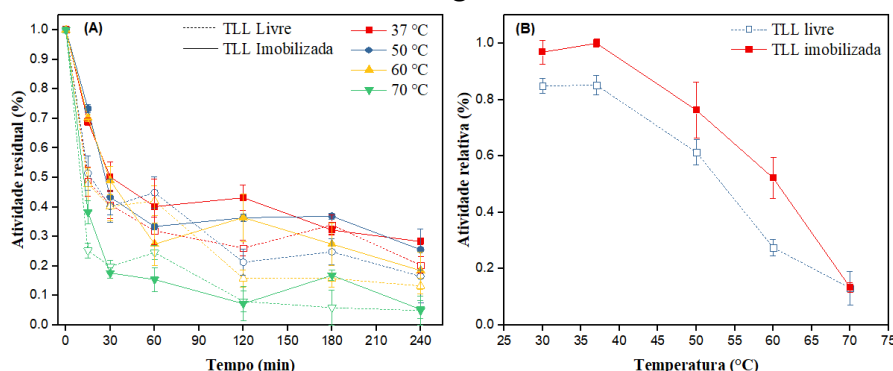


Figura 2: Estabilidade térmica do biocatalisador (A) e temperatura de máxima atividade hidrolítica (B) em pH 7,0.

A **Figura 2 (A)** expõe a melhora da estabilidade térmica da TLL imobilizada no suporte utilizado em até 4h a 60 °C, com atividade residual próxima de 20%. O tempo de meia vida do biocatalisador foi dobrado em relação à enzima livre, exceto para a temperatura de 70°C. A essa temperatura, a estabilidade térmica foi baixa e houve redução da atividade residual: menor que 10% em duas horas. A TLL imobilizada em SPION-GO apresentou maior atividade relativa em relação à enzima livre, como mostra a **Figura 2 (B)** exceto para a temperatura de 70 °C. A temperatura de maior atividade foi 37 °C.

A **Figura 3** apresenta a estabilidade do biocatalisador ao pH.

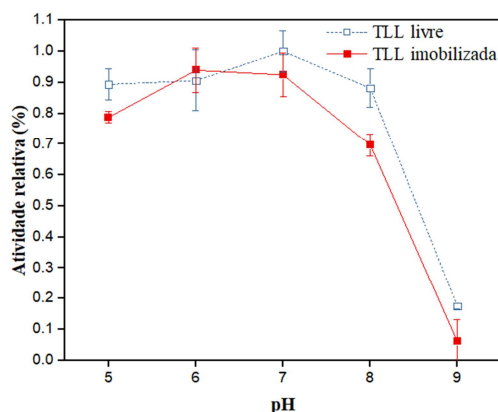


Figura 3: Estabilidade enzimática do biocatalisador à variação do pH.

A enzima livre apresentou maior atividade relativa para o pH 7 e o biocatalisador para o pH 6. Observou-se que, exceto para o pH 6, a atividade relativa para enzima livre foi superior à imobilizada. Esse comportamento diverge do esperado (ALTARUGIO; PEREIRA, 2016).

Conclusões

A lipase que se enquadrou nos maiores valores de atividade recuperada, rendimento de imobilização e atividade hidrolítica foi a TLL (48,7%, 50,07% e 697 U mg⁻¹_{proteína}, respectivamente), denominada biocatalisador. O biocatalisador apresentou um aumento de 37% na atividade de esterificação em relação à enzima livre. Ademais, a TLL imobilizada no suporte SPION-GO apresentou melhora na estabilidade térmica, apesar de não melhorar a estabilidade ao pH. Portanto, mesmo sem efeito apreciável ao pH, a estabilidade térmica e a rápida separação/recuperação por meio de magnetismo corroboram o uso do biocatalisador.

Agradecimentos

Aos orientadores; ao programa institucional de bolsas de iniciação científica; às colegas de pesquisa.

Referências

- ALTARUGIO, L. M.; PEREIRA, E. B. Imobilização de lipase de *Candida rugosa* em micropartículas de quitosana utilizando diferentes agentes ativadores. **Revista Brasileira de Iniciação Científica, Itapetininga**, v. 3, n. 1, p. 89–105, 2016.
- BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 7, p. 531–535, 1997.
- LI, Y. et al. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 182–189, 1 set. 2010.
- RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *thermomyces lanuginosus* and *rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, 1 mar. 2011.
- SEN, T. et al. Dispersion of magnetic nanoparticles in suspension. **Micro & Nano Letters, IET**, v. 1, p. 39–42, 1 ago. 2006.