

DESEMPENHO DA LIPASE MICROBIANA IMOBILIZADA EM NANO PARTÍCULAS MAGNETIZADAS

P. A. PINTO¹, P. D. MIJONE¹, H. F. De CASTRO¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena
E-mail para contato: pedro_ap8@hotmail.com

RESUMO – Nano-partículas de óxido de ferro tipicamente são magnetita Fe_3O_4 e maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, e apresentam propriedades adequadas para imobilização de enzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de partículas magnéticas sintetizadas pelo método de co-precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em solução alcalina como suporte de imobilização da enzima lipase. As partículas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) apresentaram comportamento superparamagnético. As características texturais e morfológicas da matriz magnética foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratograma de raios-X, espectroscopia no infravermelho (IV) e análise de tamanho de poros (BET). A lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada nas partículas magnetizadas por ligação covalente e o desempenho da lipase imobilizada tanto em meio aquoso (hidrólise do azeite de oliva) como em meio orgânico (esterificação e transesterificação) indicaram que o suporte não reduziu a afinidade da enzima pelos substratos. Em particular, o processo de etanolise do óleo de coco forneceu resultados promissores atingindo conversão total dos triglicerídeos em ésteres de etila em 72 h.

1. INTRODUÇÃO

O uso industrial de enzimas como catalisadores depende da eficiência de sua imobilização e do emprego de suportes adequados, de tal forma que o investimento inicial em matéria-prima (enzima e suporte) seja compensado pela elevada atividade e estabilidade do derivado imobilizado obtido (Adlercreutz, 2013). Inúmeros materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade tem sido considerados para imobilização de enzimas (Villeneuve *et al.*, 2000). Devido ao alto custo dos suportes comerciais, vários materiais de baixo custo (casca de coco, carbonato de cálcio, resíduos lignocelulósicos, óxidos metálicos) estão sendo pesquisados como alternativa as matrizes disponíveis comercialmente (Adlercreutz, 2013).

A imobilização de enzimas em suportes magnetizados tem sido considerada um dos métodos mais atrativos e de grande interesse, pois permite a separação e recuperação da enzima por meio da influencia de um campo externo causado por um eletroímã. Além disso, a utilização de partículas magnéticas apresenta flexibilidade de modificação da superfície com cadeias que facilita ou promove uma melhor e mais forte interação com a enzima levando ao aumento da estabilidade no processo de imobilização. Devido às características das partículas magnetizadas, este catalisador apresenta melhor eficiência cinética quando comparado com catalisadores heterogêneos tradicionais (Polshettiwar *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de partículas magnéticas sintetizadas pelo método de co-precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em solução alcalina como suporte de imobilização da enzima lipase.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os experimentos foram realizados com lipase de microbiana (*Burkholderia cepacia*), adquirida da Sigma Chemicals Co (Amano PS). Como materiais de partida para reação de esterificação foram usados *n*-butanol e ácido butírico. Na reação de transesterificação foram usados: etanol anidro (99%, Cromoline) e óleo de coco adquirido da Frescoco (São Paulo-SP), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de: 8,9% Caprílico, 6,2% Cáprico, 47,1% Láurico, 18,8% Mirístico, 7,9% Palmítico, 2,6% Esteárico, 6,1% Oleico e 1,6% Linoleico.

2.2. Síntese de óxido de ferro pela co-precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3}

Em 300 mL de água ultra-pura (UP) foram lentamente adicionados 30 mL de uma solução de FeCl_2 0,6 M sob forte agitação mecânica, seguida da adição lenta de 30 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,1 M. Em seguida, a temperatura do meio reacional foi ajustada para 80 °C e o pH ajustado para 11,0 por meio da adição lenta de NaOH 4M sob vigorosa agitação mecânica. O procedimento conduziu a formação de uma solução de coloração negra, a qual foi mantida por 30 min nessas condições (80 °C; pH 11,0; vigorosa agitação mecânica). O béquer com a mistura obtida (massa negra) permaneceu em repouso sobre um ímã (campo magnético externo) para auxiliar a separação das partículas magnetizadas. As partículas magnéticas ficaram depositadas na parte inferior do bequer na forma de uma massa escura. O sobrenadante foi removido e o pH medido. Na massa negra foram efetuadas lavagens com água UP e com solução de acetato de etila e água UP na proporção 1:1. A massa negra obtida foi levada a secagem. As características texturais e morfológicas da matriz foram determinadas por difratograma de raios-X, espectroscopia no infravermelho (IV), análise de tamanho de poros (BET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.3. Imobilização da lipase no suporte magnetizado

O suporte magnetizado foi silanizado com solução de γ -aminopropiltriétoxissilano (γ -APTS) a 0,5%(v/v) em heptano e ativado com glutaraldeído, conforme descrito por Soares *et al.*, 2000. Em seguida a lipase de *B. cepacia* foi imobilizada via ligação covalente no suporte magnetizado por meio do contato da enzima com o suporte (0,30 g/g suporte) juntamente com solução aquosa de 5 g L^{-1} de polietilenoglicol (100 $\mu\text{L/g}$ suporte), por um período de 18 h a 4 °C. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo seguida de lavagem com hexano para reduzir o teor de água a valores inferiores a 15 %. As atividades hidrolíticas da lipase livre e dos derivados imobilizados foram quantificadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva (Soares *et al.*, 1999) e o rendimento de imobilização ($\eta\%$) calculado pela relação de unidades de atividade oferecida para imobilização e a quantidade recuperada pelo derivado imobilizado. As velocidades iniciais das reações de hidrólise foram determinadas empregando substratos contendo proporções entre 10 a 50% (m/v) de azeite de oliva em

solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As constantes cinéticas k_m e V_{\max} foram estimadas pelo Programa Hyper 32.

2.4. Esterificação do ácido butírico com butanol

As reações de esterificação foram realizadas em frascos de vidro de 100 mL fechados, sob agitação de 150 rpm a 40 °C. O meio reacional foi composto por 20 mL de solução de *n*-butanol (140 mM) com ácido butírico (160 mM) em heptano. Foram empregados 1,0 g de lipase imobilizada como catalisador da reação. Aliquotas foram retiradas do meio reacional em intervalos pré-definidos para quantificação da concentração residual do ácido butírico por titulometria e concentrações de butanol e butirato de butila por cromatografia de fase gasosa (Soares *et al.*, 1999).

2.5. Reação de transesterificação do óleo de coco

As reações foram efetuadas em balões volumétricos de (125 mL), acoplados com condensador de refluxo nas seguintes condições fixas: 20 gramas de meio reacional na razão molar óleo/etanol de 1:8; 20% de biocatalisador em relação à massa de meio reacional e agitação mecânica de 250 rpm por 72 h. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação. As concentrações de ésteres de alquila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa empregando metodologia descrita por Urioste *et al.*, 2008. A viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foi determinada utilizando-se viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas de viscosidade foram feitas empregando 1 mL da amostra purificada a 40°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese do óxido de ferro

A síntese do óxido de ferro a partir da co-precipitação alcalina dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} resultou em uma mistura escura e homogênea composta de água, $\text{Fe}_2\text{O}_3(\text{s})$ em suspensão e íons Fe^{3+} e Fe^{2+} residuais. Para a obtenção do Fe_3O_4 sólido e isolado, o óxido de ferro úmido (Figura 1A) foi submetido a uma decantação forçada pela ação de um ímã forte, como representado na Figura 1B.

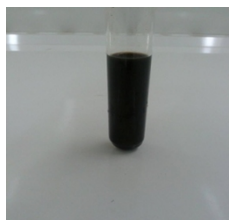


Figura 1 A –Ilustração da suspensão de Fe_3O_4



Figura 1B- Fase sólida (Fe_3O_4) e fase aquosa

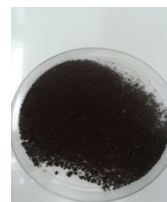


Figura 1C-Partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{s})$.

Após a decantação do óxido de ferro úmido, as fases sólida e aquosa foram separadas para a obtenção do $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{s})$ isolado. O ferro recolhido foi filtrado a vácuo para retirar parte da água remanescente e em seguida levado a secagem em estufa a 60°C por 24h. Depois de seco,

o óxido de ferro foi triturado. Na Figura 1C encontra-se o $\text{Fe}_3\text{O}_{4(s)}$ pronto para ser silanizado e ativado para posterior utilização como suporte para a imobilização da lipase *B.cepacia*.

3.2. Caracterização do suporte magnetizado

Os valores da área superficial específica ($49,0 \pm 2,5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e volume de poros da matriz produzida ($0,07 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) determinados por adsorção de um gás em equilíbrio, em condições isotérmicas utilizando o método B.E. T são similares aos descritos na literatura.

O espectro de transmitância na região do infravermelho, mostrado na Figura 2, apresenta uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} com um ombro em 3250 cm^{-1} que foram atribuídas ao grupamento O-H de hidroxilas ligadas ao ferro. O grupamento O-H é proveniente da água de hidratação e de cristalização. A banda em 1630 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular da água $\delta\text{H-O-H}$. As bandas em 600 a 500 cm^{-1} são atribuídas a Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ na ligação entre Fe-O-Fe.

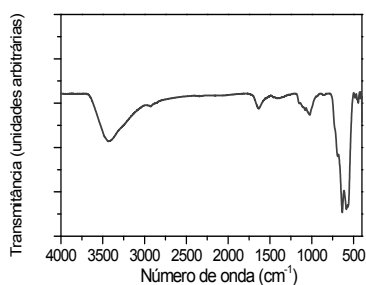


Figura 2-Espectro na região do infravermelho das partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$

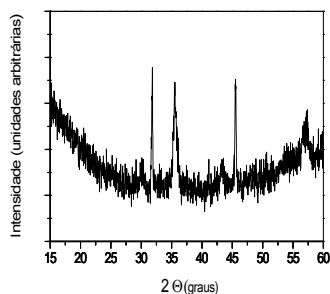


Figura 3- Difratografia de Raios X das partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$

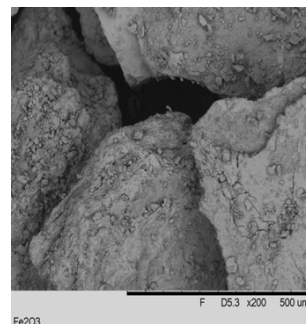


Figura 4- MEV das partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

A caracterização estrutural foi realizada a partir da difração de raios-X (Figura 3). Picos na posição de $30,0^\circ$, $35,5^\circ$, $43,1^\circ$, $53,4^\circ$, $57,0^\circ$ e 63° , como encontrados neste trabalho, são característicos de magnetita de fase cristalina. Entretanto, de forma generalizada, o difratograma apresentou picos estreitos e as resoluções das linhas espectrais apresentaram muito ruído.

A microscopia eletrônica de varredura na ampliação de 200 vezes permitiu verificar as magnetita/ maghemita (Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$). A heterogeneidade da forma das partículas foi atribuída à alta energia de atração superficial das partículas magnéticas. O suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ possui pequenos aglomerados cristalinos na superfície da matriz, conforme pode ser observado, na Figura 4.

3.3. Imobilização da lipase no suporte magnetizado

Os valores de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização estão descritos na Tabela 1. Observa-se que a técnica de imobilização proposta foi bem sucedida, indicando que aproximadamente 50% de recuperação de atividade. Entretanto, os parâmetros cinéticos (K_m e

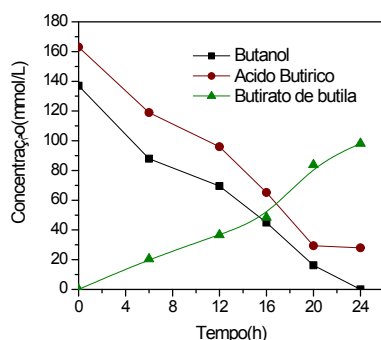
V_{max}) determinados indicaram que a imobilização reduziu aproximadamente 65% da afinidade da enzima pelo substrato.

Tabela 1 – Atividades hidrolíticas, rendimento de imobilização e constantes cinéticas da lipase livre e imobilizada.

Lipase	Atividade (U g ⁻¹)	Rendimento de Imobilização (η%)	V_{max} (U·g ⁻¹)	K_m (mmol·L ⁻¹)
Livre	10643 ± 38	-	12390	410
Imobilizada	982 ± 24	53,4	1786	1262

3.4. Desempenho na síntese de éster de butila

A lipase *B.cepacia* imobilizada no suporte Fe₃O_{4(s)} foi utilizada como catalisador da reação de esterificação do ácido butírico com o butanol. A Figura 5 mostra as curvas de consumo dos materiais de partida (ácido butírico e butanol) e da formação do produto (butirato de butila) ao longo do tempo de reação. A reação apresentou rendimento elevado (75%) e em 24h de reação o álcool (reagente limitante) foi totalmente consumido, sendo o éster formado na mesma proporção molar, como esperado pela estequiometria da reação.



Atividade de esterificação= 56.7 μM/g·min
Produtividade= 0.58 g/L·h
Rendimento = 75 (%)

Figura 5- Perfil de formação do butirato de butila e consumo dos materiais de partida na reação de esterificação do butanol com ácido butírico

3. 5. Desempenho na síntese de ésteres de etila

O desempenho do biocatalisador imobilizado foi também verificado na reação de etanolise do óleo de coco. Nas condições testadas o derivado imobilizado forneceu perfil típico em termos de formação dos ésteres de etila (Tabela 3).

Tabela 3. Propriedades dos ésteres de etila obtidos na reação de transesterificação do óleo de coco com etanol catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte magnetizado.

Concentração de ésteres de etila no meio reacional (m/m%)								Rendimento (%)	Viscosidade (mm ² /s)
C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2		
6,8	4,1	34,7	13,9	4,1	1,4	2,7	1,2	99,5	3,8

O principal éster produzido foi o laurato de etila (C12), seguido do oleato de etila (C18), sendo os outros ésteres produzidos em menor quantidade. Esse perfil encontra-se dentro do esperado, tendo em vista que a composição do óleo de coco é constituída predominantemente de ácido láurico. O valor máximo de concentração de ésteres de etila foi da ordem de 68,75%, correspondendo a um rendimento de 99,53%. Esse valor é superior a norma adotada pela ANP (94,3%) para a adequação do biodiesel como biocombustível. Verifica-se ainda que o valor de viscosidade cinemática obtido foi coerente com o valor de rendimento de transesterificação.

4. CONCLUSÕES

O processo de co-precipitação em meio alcalino para a obtenção de partículas magnéticas resultou em partículas em forma de pó de coloração preta que exibiram magnetização quando expostas a um campo magnético. O conjunto de resultados obtidos mostra que a preparação de lipase imobilizada em suporte magnetizado atuou de forma eficiente nas reações típicas da enzima lipase, tanto em meio aquoso como não aquoso.

5. REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.* v.42, p. 6406-6436, 2013.
- POLSHETTIWAR V.; LUQUE R.; FIHRI A.; ZHU H.; BOUHRARA M.; BASSET J. M. Magnetically recoverable nanocatalysts. *Chem. Rev.*, v. 111, p. 3036-3075, 2011.
- SOARES, C.M.F., DE CASTRO, H.F., MOARES, F.F., ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 77, p. 745-757, 1999.
- VILLENEUVE, P; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Cat. B-Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.
- URIOSTE, D.; CASTRO, M. A. B.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Quim. Nova*, v. 31, p. 407-412, 2008.