

## Lipase imobilizada em hidróxido duplo lamelar: valorização de resíduos industriais para obtenção de biocatalisador heterogêneo

### Lipase immobilized in lamellar double hydroxide: recovery of industrial waste to obtain heterogeneous biocatalyst

Isabela Nunes Francisco<sup>1</sup>, Camila Taynara Cardoso dos Santos<sup>2</sup>, Valéria Marta Gomes do Nascimento<sup>3</sup>, Alesandro Bail<sup>4</sup>, Patrícia Salomão Garcia<sup>5</sup>, Alessandra Machado Baron<sup>6</sup>

#### RESUMO

O aproveitamento de resíduos industriais para a produção de hidróxidos duplos lamelares (HDL) é uma alternativa relevante para a redução dos custos referentes às matérias-primas e torna o processo de produção mais sustentável. Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) pertencem a categoria de argilas sintéticas e são utilizados como trocadores iônicos. Podem ser obtidos através de resíduos industriais, sendo uma das aplicações, como suporte na imobilização de enzimas, como as lipases, que catalisam reações com transferência de grupos acila e tendem a ser mais estáveis quando imobilizadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi imobilizar lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em hidróxido duplo lamelar (HDL) formado por zinco, ferro e alumínio, contendo cloreto a partir de ácidos de decapagem (RAD), avaliando a eficiência de imobilização e a retenção da atividade. A imobilização da enzima ocorreu por adsorção física, utilizando a proporção de 50 mg de proteína por grama de suporte em 120 mL de solução de extrato enzimático em tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, por 24 h, 25 °C e 100 rpm. A cinética de imobilização foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo (6, 12, 18 e 24 h), pela atividade hidrolítica residual no sobrenadante. O desaparecimento da atividade residual, em 24 h, foi de 74% e a retenção da atividade foi de 78%. A utilização de suportes obtidos a partir de resíduos industriais podem ser uma opção para a obtenção de um produto de alto valor agregado e contribuir com a sustentabilidade de processos químicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hidrólise; HDL; Sustentabilidade.

#### ABSTRACT

The use of industrial waste to produce lamellar double hydroxides (LDH) is a relevant alternative for reducing raw material costs and making the production process more sustainable. Lamellar double hydroxides (LDHs) belong to the category of synthetic clays and are used as ion exchangers. They can be obtained from industrial waste, one of the applications being as support in the immobilization of enzymes, such as lipases, which catalyze reactions with the transfer of acyl groups and tend to be more stable when immobilized. Thus, the objective of this work was to immobilize lipases from *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 in lamellar double hydroxide (LDH) formed by zinc, iron and aluminum, containing chloride from waste pickling acids (WPA), evaluating the immobilization efficiency and retention of the activity. The enzyme was immobilized by physical

<sup>1</sup> Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: isanunesfrancisco@gmail.com. ID Lattes: 5282245484707725.

<sup>2</sup> Bolsista CAPES Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: camilataynara@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2980288773487735.

<sup>3</sup> Docente no Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Assis, São Paulo, Brasil. E-mail: valeria@assis.unesp.br. ID Lattes: 1259574638814069.

<sup>4</sup> Docente no Departamento de Química/ Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: alebail@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1280246965220928.

<sup>5</sup> Docente no Curso de Licenciatura em Química/Coliq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: patriciagarcia@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7407591269382580.

<sup>6</sup> Docente no Curso de Licenciatura em Química/Coliq/Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: alessandrab@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2924628034072098.



adsorption, using a proportion of 50 mg of protein per gram of support in 120 mL of enzyme extract solution in phosphate buffer pH 7.0, 0.05 mol L<sup>-1</sup>, for 24 h, 25 °C and 100 rpm. The immobilization kinetics were monitored at different time intervals (6, 12, 18 and 24 h), by the residual hydrolytic activity in the supernatant. The disappearance of residual activity in 24 hours was 74% and the retention of activity was 78%. The use of supports obtained from industrial waste can be an option for obtaining a product with high added value and contributing to the sustainability of chemical processes.

**KEYWORDS:** Hydrolysis; LDH; Sustainability.

## INTRODUÇÃO

O aproveitamento e valorização de resíduos industriais estão sendo cada vez mais estudados e uma das suas possíveis aplicações, é a utilização para obtenção de suportes na imobilização de enzimas. Entretanto, não há muitas pesquisas envolvendo materiais obtidos a partir de resíduos industriais para a mesma finalidade (BARON et al., 2022).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são materiais formados pelo empilhamento de hidróxidos duplos, contendo espécies aniônicas entre as camadas e podem ser obtidos através de resíduos industriais. As suas principais características são a capacidade de troca iônica, estabilidade térmica, alta porosidade, reutilização e fácil recuperação (ISMAIL; BAEK, 2020). Tais propriedades os tornam utilizáveis como catalisadores e suporte para enzimas, adsorventes, entre outros (GONÇALVES et al., 2023).

Os estudos de Farias et al. (2021), mostraram êxito na síntese de HDLs de cloreto de ferro-zinco-alumínio, utilizando resíduos industriais denominado resíduos ácido de decapagem (RAD) e aluminato de sódio (NaAlO<sub>2</sub>) de fontes secundárias, tendo como regulador de pH uma solução de hidróxido de sódio. Esse material ainda não foi empregado como suporte para imobilização de lipases, sendo uma possibilidade de se obter um biocatalisador heterogêneo através da valorização de resíduos industriais.

As lipases (Glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas atuantes na interface orgânico-aquosa, que catalisam a hidrólise de ligações éster, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. Além disso, em meios não aquosos, agem catalisando também reações de esterificação e transesterificação (BORELLI; TRONO, 2015). Podem ser empregadas em áreas como processamento de gordura/óleo, alimentos, cosméticos, oleoquímicos, preparações farmacêuticas e gestão ambiental (KIM; HWANG; AKOH, 2023).

A utilização de lipases e enzimas em geral é vantajosa quando comparada aos catalisadores químicos, já que apresenta menor requerimento energético, condições moderadas de operação e menor formação de subprodutos (MEUNIER; KARIMINIA; LEGGE, 2017). Entretanto, biocatalisadores apresentam algumas desvantagens como custos elevados, baixa estabilidade (desnaturação) e não podem ser facilmente recuperadas ao final da reação. A imobilização seria uma alternativa para minimizar tais inconvenientes (ALMEIDA et al., 2021).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi imobilizar lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, em suporte HDL obtido através do aproveitamento de um resíduo industrial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### SUPORTE HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL)

O material foi sintetizado pelo Grupo de Química de Materiais e Tecnologias Sustentáveis (GQMATS) da UTFPR campus Londrina. O hidróxido duplo lamelar é formado por zinco, ferro e alumínio contendo cloreto a partir de resíduos industriais. O método de síntese utilizado foi o de coprecipitação.

## LIPASE

As lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 (massa molecular 32 kDA) foram isoladas no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Campus de Assis e identificada por métodos morfológicos e moleculares (16S rRNA) na Fundação André Tosello (FAT).

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

## PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Para o processo de imobilização, o HDL (suporte) foi lavado com duas porções de 5 mL de tampão fosfato pH 7,0 a 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Após secagem em dessecador por 12 h, colocou-se em um erlenmeyer 0,5 g do suporte e 77 mL do extrato enzimático diluídos na mesma solução tampão utilizada na etapa anterior, para conter a concentração de proteína de 50 mg de proteína por grama de suporte. A mistura foi agitada a 100 rpm (25 °C) por 24 h. A cinética de imobilização foi acompanhada através da dosagem da atividade residual, por meio da retirada de alíquotas de 0,5 mL no intervalo de 6 h. Através da filtração a vácuo, separou-se o imobilizado (HDL-Lip) e lavou-o com a solução tampão empregada anteriormente, deixando-o secar no dessecador por 12 h e após o procedimento armazenou-o a 4 °C. O processo foi acompanhado pela dosagem da eficiência de imobilização e retenção da atividade conforme as Equações 1 e 2, respectivamente (CASTRO et al. 2021).

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

Em que,  $A_i$  a atividade hidrolítica (U) da solução aquosa de lipase antes da imobilização e  $A_f$  a atividade hidrolítica (U) remanescente no sobrenadante após o procedimento de imobilização, ambas medidas em meio aquoso e em triplicata, conforme descrito na seção posterior.

$$R = \frac{A_o * 100}{A_T} \quad (2)$$

Em que,  $A_o$  é a atividade hidrolítica do HDL-Lip (U g<sup>-1</sup> do suporte) medida em meio aquoso e  $A_T$  é a atividade teórica da enzima imobilizada (U g<sup>-1</sup> do suporte), calculada segundo a Equação 3.

$$A_T = \frac{(A_i - A_f)}{\text{massa do HDL}} \quad (3)$$

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para a determinação da atividade lipolítica utilizou-se o método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP, Sigma-Aldrich) (WINKLER; STUCKMANN, 1979), em que analisou a atividade lipolítica da solução enzimática antes ( $A_i$ ) e após a imobilização ( $A_f$ ) e



a atividade enzimática da enzima imobilizada ( $A_0$ ). O método baseia-se na hidrólise do pNPP pela enzima em meio aquoso, que contém como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (pNP) como produto da reação, apresenta coloração amarela e pode ser quantificado a 410 nm.

No procedimento utilizou-se 0,9 mL de meio reacional, preparado a partir da mistura de 0,1 mL da solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila em 1 mL de isopropanol) com 0,9 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 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0). Aos 0,9 mL do meio reacional, adicionou-se 0,1 mL de tampão (para o branco) ou 0,1 mL da solução enzimática para as amostras. A reação foi realizada em cubeta de 1 mL em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS), por 1 minuto (55 °C, 410 nm).

Já para a atividade da enzima imobilizada, usou-se 5 mL de meio reacional e aproximadamente 1 mg da enzima imobilizada. A reação foi realizada em erlenmeyer de 25 mL sob agitação em ultrassom (Schuster L200, 55 °C) e foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada minuto, por 5 min, para leitura em espectrofotômetro (410 nm).

Ambas as atividades foram realizadas em triplicata, calculadas conforme a Equação 4. As unidades de atividade enzimática foram definidas como U mL<sup>-1</sup>, onde U é 1 μmol de pNP produzido por minuto por mL da solução enzimática, e como U g<sup>-1</sup>, na qual U é 1 μmol de pNP produzido por minuto por grama de HDL-Lip, respectivamente.

$$Atividade = \frac{C_A * X}{\epsilon * Z} \quad (4)$$

Em que,  $C_A$ : coeficiente angular da regressão linear (absorbância x tempo em min); X: fator de diluição ou volume do meio reacional (mL);  $\epsilon$ : coeficiente de absorvidade molar para o tampão fosfato pH 7,0 (0,8 10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>); Z: volume da solução enzimática (mL) ou massa da enzima imobilizada (g).

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

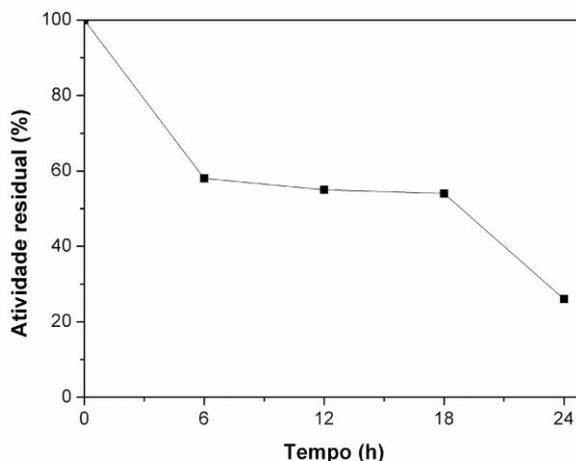
A concentração de proteínas na solução enzimática inicial foi de 0,651 ± 0,013 μg mL<sup>-1</sup> (mg de proteína por mL do extrato enzimático contendo lipase), determinada, em triplicata, por meio do método de Bradford (1976), utilizando como proteína padrão o soro albumina bovina (BSA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo de cinética de imobilização, em que se analisou o tempo de contato entre o extrato enzimático e o suporte, observou-se que houve um decréscimo na atividade do sobrenadante em relação ao tempo de imobilização e que ocorreu eficiência de imobilização de 74% no período de 24 h, conforme a Figura 1.

Os cálculos mostraram que a  $A_0$  foi de 2,32 U mg<sup>-1</sup> e a  $A_T$  foi de 1,46 U mg<sup>-1</sup>, sendo a retenção da atividade (R%) de 158%, indicando ativação da enzima após a imobilização.

Figura 1 – Cinética de imobilização da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em HDL ZnFeAl utilizando tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Atividade residual no sobrenadante determinada pelo método pNPP aquoso. O ensaio foi realizado em duplicata.



FONTE: Autoria própria (2023).

Dias et al. (2019) imobilizaram lipases de *Pseudomonas cepacia*, em HDL (Zn/Al-Cl) com materiais que não são oriundos de resíduos. A retenção da atividade foi 180% e a concentração de proteínas ficou entre 32,5 a 162,5 mg g<sup>-1</sup> de suporte. No referido estudo, as reações de hidrólise foram realizadas com trioleína (um éster diferente do pNPP) e em solvente apolar (*n*-hexano).

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a imobilização das lipases de *Burkholderia lata* no hidróxido de duplo lamelar, formado por zinco, ferro e alumínio contendo cloreto, obtido a partir de resíduos ácidos de decapagem apresentou resultados promissores para estudos futuros utilizando a HDL-Lip.

## Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR-Apucarana (LAMAP), pela utilização do Espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro (bolsa de iniciação científica) para o desenvolvimento do projeto.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS



ALMEIDA, F.L.C., et al. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 37-51, 2021.

BARON, A. M., et al. Metal-organic framework based on iron and terephthalic acid as a multiporous support for lipase *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 and its potential for biocatalysis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 41, p. 332-343, 2022.

BORELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 20774-20840, set. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASTRO, M. da. C., et al. Lipase immobilization on biodegradable film with sericin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, p. 660-667, 2021.

DIAS, G. S. et al. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, nov. 2019.

FARIAS, L. B. N. de. et al. Nanoflakes of chloride zinc-iron-aluminum-based layered double hydroxides obtained from industrial waste: a green approach to mass-scale production. **RSC Advances**, v. 11, n.29, p. 17760-17768, 2021.

GONÇALVES, R. G. L. et al. Highly porous CuZnAl layered double hydroxides prepared by biochar-templated co-precipitation method as catalysts for the preferential oxidation of CO reaction. **Applied Clay Science**, v. 232, fev. 2023.

ISMAIL, A.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **Int J Biol Macromol.**, v. 163, p. 1624-1639, nov. 2020.

KIM, B. H.; HWANG, J.; AKOH, C.C. Liquid microbial lipase — recent applications and expanded use through immobilization. **Current Opinion in Food Science**, v. 50, abr. 2023.

MEUNIER, Sarah M.; KARIMINIA, Hamid-Reza; LEGGE, Raymond L. **Immobilized Enzyme Technology for Biodiesel Production**. In: Advances in Biofeedstocks and Biofuels. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, p. 67-106, 2017.

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