



## Estabilidade ao pH de lipases imobilizadas em estruturas metalorgânicas

### pH stability of lipases immobilized on metal-organic frameworks

Danilo Rafael Carvalho dos Santos<sup>1</sup>, Michael da Conceição de Castro<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

Estruturas metalorgânicas (MOFs) são materiais versáteis, pois possuem uma grande área de superfície interna e poros ajustáveis, tornando-os adequados para imobilização enzimática. Após a imobilização de enzimas, alguns parâmetros relacionados à imobilização e estabilidade da enzima imobilizada devem ser avaliados a fim justificar a etapa de imobilização. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade ao pH de lipases de *Burkholderia lata* (BLL) imobilizadas em MOF Fe-BDC (ácido 1,4-benzenedicarboxílico). A MOF foi obtida por processo solvotérmico, para produzir adicional meso e macroporos interligados entre si, capazes de imobilizar a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 (BLL) por aprisionamento e adsorção física. Para avaliar a estabilidade ao pH, a BLL@BDC foi incubada por 1 h, 25 °C em diferentes tampões com pHs entre 2,5 à 10. A maior estabilidade (124 ± 8,36%) foi observada para o pH 4, mas a enzima foi bastante estável também na faixa de pH 2,5 à 7. A imobilização de lipases é uma importante alternativa para a redução dos custos referentes à obtenção de um biocatalisador heterogêneo. Além disso, lipases que apresentam estabilidade em condições ácidas podem ser úteis para as indústrias de laticínios, alimentícias e no tratamento de óleos usados.

**PALAVRAS-CHAVE:** estabilidade ao pH; imobilização; MOF.

#### ABSTRACT

Metal-organic frameworks (MOFs) are versatile materials as they have a large internal surface area and tunable pores, making them suitable for enzyme immobilization. After enzyme immobilization, some parameters related to immobilization and stability of the immobilized enzyme must be evaluated in order to justify the immobilization step. Therefore, the objective of this work was to evaluate the pH stability of *Burkholderia lata* lipases (BLL) immobilized in MOF Fe-BDC (1,4-benzenedicarboxylic acid). The MOF was obtained by a solvothermal process, to produce additional meso- and macropores interconnected, capable of immobilizing the lipase from *B. lata* LBBIO-BL02 (BLL) by entrapment and physical adsorption. To evaluate pH stability, BLL@BDC was incubated for 1 h, 25 °C in different buffers with pHs between 2.5 and 10. The greatest stability (124 ± 8.36%) was observed for pH 4, but the enzyme was also quite stable in the range of pH 2.5 to 7. Immobilization of lipases is an important alternative for reducing costs related to obtaining a

<sup>1</sup> Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: danilo.1999@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2089878032640669.

<sup>2</sup> Bolsista CAPES Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: mikael2099@hotmail.com. ID Lattes: 6108603875595102.

<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.



heterogeneous biocatalyst. Furthermore, lipases that exhibit stability in acidic conditions can be useful in the dairy and food industries and in the treatment of used oils.

**KEYWORDS:** pH stability; immobilization; MOF.

## INTRODUÇÃO

As estruturas metalorgânicas (MOFs) têm se destacado na última década, como materiais empregados como suporte para imobilização de enzimas, apresentando uma ampla gama de aplicações em diversas áreas científicas. Diferentemente de outros materiais nanoporosos, como zeólitas, sílica e materiais carbonáceos, a morfologia e a funcionalidade dos MOFs podem ser personalizadas para atender a aplicações específicas. Essas características fazem dos MOFs um material bastante atrativo para atuar como suportes em imobilização de enzimas, seus sítios funcionais podem interagir com enzimas e seus poros e sua elevada área superficial possibilitam acomodar uma quantidade significativa de enzimas, resultando em uma alta eficiência de imobilização (MEHTA et al., 2016; WANG; ZHAO; YU, 2016; HU et al., 2018).

A imobilização de lipases em MOFs (estruturas metalorgânicas) têm se mostrado uma estratégia promissora para melhorar a estabilidade, reutilização e eficiência dessa enzima, possibilitando sua aplicação em diferentes processos. As lipases são enzimas versáteis que atuam como catalisadoras em reações químicas de transferência de grupos acila. Elas desempenham um papel crucial na hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, resultando na formação de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essas enzimas possuem uma ampla variedade de aplicações industriais, abrangendo setores como alimentos, medicamentos, detergentes, pesticidas e couro (BARON et al., 2022). No entanto, o uso prático das lipases em sua forma original enfrenta obstáculos devido à instabilidade operacional em longo prazo, à complexidade do processo subsequente e à dificuldade na recuperação e reutilização. Para superar esses desafios, a imobilização de lipases em suportes sólidos é um método que protege a enzima contra a desnaturação e a perda de seu poder catalítico em reações químicas sob condições adversas (WANG; ZHAO; YU, 2016).

Após o processo de imobilização, os parâmetros relacionados à estabilidade da enzima, como estabilidade ao pH devem ser estudados a fim de justificar o processo de imobilização e para compreender sobre possibilidades de aplicações biocatalíticas da enzima imobilizada. Por isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade ao pH da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 imobilizada em MOF Fe-BDC.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### SUPORTE ESTRUTURA METALORGÂNICA (MOF)

O material foi sintetizado pelo Grupo de Química de Materiais e Tecnologias Sustentáveis (GQMATS) da UTFPR campus Londrina, por processo solvotérmico (PU et al., 2018) conforme Haque et al. (2011) com modificações. Um procedimento típico para a síntese é descrito a seguir: 5,13 g de ácido 1,4-benzenedicarboxílico (BDC) (0,030 mol) foram dissolvidos em 300 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) em um béquer sob agitação magnética (500 rpm) por 10 min em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida,



5,00 g de  $\text{FeCl}_3$  (0,030 mol) foram adicionados ao béquer sob agitação magnética até a dissolução total do sal de ferro. Após, foram adicionados 300 mL de etanol anidro à solução de DMF, agitados por alguns segundos até completa homogeneização, seguido de transferência para um frasco de vidro de 1 L, que foi hermeticamente fechado. O frasco foi levado à estufa a  $80^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, o sólido laranja acastanhado (MOF) e seu sobrenadante foram transferidos para tubos de polietileno e centrifugados a 180 xg por 3 min, lavados com água destilada e 20 mL de etanol anidro e depois secos a  $80^\circ\text{C}$  por aproximadamente 12 h. A MOF Fe-BDC foi pulverizada e peneirada para separar a porção de tamanho entre 75 e 150  $\mu\text{m}$ . O material foi tratado termicamente em forno a  $250^\circ\text{C}$  por 4 horas para remoção de qualquer solvente remanescente. Por fim, o material foi armazenado em frascos de propileno.

## 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) e a imobilização foi realizada simultaneamente por adsorção física e aprisionamento, pelo grupo Biopase da UTFPR campus Apucarana. A atividade da BLL@BDC foi dosada antes e após o estudo de estabilidade ao pH, através da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP).

## PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO

Os tampões utilizados para os estudos de estabilidade ao pH foram preparados com as seguintes substâncias: Tampão Glicina-HCl (pH 2,5); Tampão Citrato (pH 3 a 6), utilizando o ácido cítrico e o fosfato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ); Tampão Fosfato (pH 7 e 8); Tampão Glicina-NaOH (pH 9 e 10), todos na concentração de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

## ESTABILIDADE AO pH DA BLL@BDC

A estabilidade ao pH foi determinada incubando 1 mg da BLL@BDC em tampões previamente preparados e com valores de pH de 2,5 à 10, por 1 h, em temperatura ambiente. Após a incubação, a atividade residual, expressa em %, foi determinada utilizando tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 pelo método da hidrólise do *p*NPP. As atividades foram comparadas com a atividade determinada em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 sem incubação prévia (atividade de 100%,  $9,3 \pm 0,9 \text{ U mg}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram em triplicata.



## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para a determinação da atividade lipolítica da BLL@BDC 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 enzima imobilizada. O método baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima em meio aquoso, que contém como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP) como produto da reação, apresenta coloração amarela e pode ser quantificado a 410 nm.

Utilizou-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 (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS), 410 nm. A cada leitura, a alíquota retornava para o meio reacional.

Para cada estudo de pH, as atividades foram realizadas em triplicata, calculadas conforme a Equação 1. A unidade de atividade enzimática foi definida como U mg<sup>-1</sup>, na qual U é 1 μmol de *p*NP produzido por minuto por grama de BLL@BDC.

$$A = \frac{C_A \times V}{\epsilon \times Me} \quad (1)$$

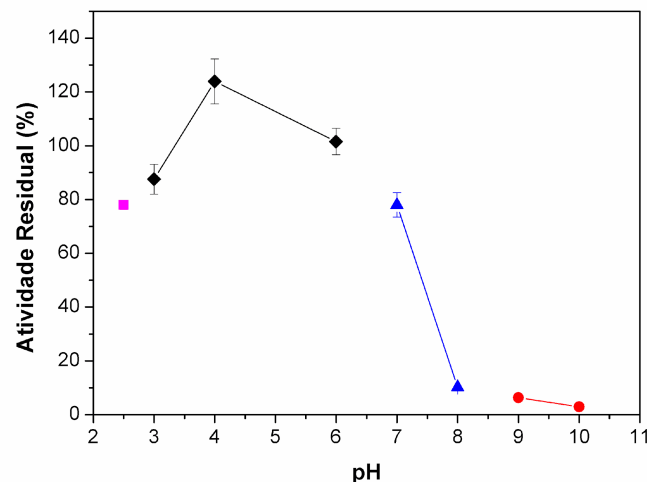
Onde,  $C_A$ : coeficiente angular da regressão linear (absorbância x tempo em min);  $V$ : volume do meio reacional (mL);  $\epsilon$ : coeficiente de extinção molar para o tampão fosfato pH 7,0 ( $0,8 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );  $Me$ : massa da enzima imobilizada (mg).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados mostram que a BLL@BDC foi ativada quando incubada em pH 4, apresentando  $124 \pm 8,36\%$  de atividade residual, ou seja, atividade superior à enzima não incubada. Este efeito foi relatado para outras lipases, mas nenhum mecanismo foi proposto para explicar este fenômeno (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, a enzima manteve-se estável em valores de pH entre 2,5 e 7, após incubação por 1 h a 25 °C (Figura 2). Em pH 6, a enzima apresentou  $100 \pm 4,9\%$  de atividade residual. Ao entrar em contato com o tampão Glicina-HCl pH 2,5, tampão Citrato pH 3,0 e tampão Fosfato pH 7,0 apresentou atividade residual próxima a 80%.



Figura 2 – Estabilidade ao pH da BLL@BDC. Condições: Atividade residual em reações de hidrólise do pNPP, 55 °C, após incubação em diferentes pH por 1 h a 25 °C. Tampões usados para os ensaios (0,05 mol/L): Glicina-HCl pH 2,5 (■), Citrato pH 3,0 a 6,0 (◆), Fosfato pH 7,0 e 8,0 (▲) e Glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0 (●). A atividade foi comparada com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, sem prévia incubação (atividade de 100%). Ensaios em triplicata.



Fonte: Autoria própria (2023).

A avaliação da estabilidade de enzimas ao pH é parâmetro importante a ser estudado pois possibilita relacionar com possíveis aplicações na biocatálise. Por exemplo, lipases que apresentam estabilidade em condições ácidas podem ser úteis para as indústrias de laticínios, alimentícias e no tratamento de óleos usados. Na indústria de laticínios, a lipase hidrolisa a gordura do leite, isso poderia melhorar muito o sabor dos produtos lácteos e aumentar seu valor nutricional. Na indústria alimentícia, lipases podem ser usadas para melhorar a qualidade de produtos assados, no processo de branqueamento de pães mais escuros e prolongar sua vida útil. Pode contribuir na síntese de ésteres de aromas de frutas (YAO et al., 2021). A lipase também pode ser usada para refinar o óleo e remover ácidos graxos livres, este método também pode ser usado para modificar óleos de qualidade inferior para obter um produto de alto valor agregado (KONKIT; 2016).

## CONCLUSÃO

A BLL@BDC foi estável em pHs ácidos e apresentou baixa estabilidade em pHs acima de 8,0. Outros estudos relacionados às aplicações biocatalíticas da BLL@BDC devem ser realizadas como etapas futuras a fim potencializar a eficiência catalítica da enzima.

## Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR-Apucarana (LAMAP), pela utilização do Espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent).



## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- BARON, Alessandra Machado *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**, p. 1-12, 2022.
- HAQUE, Enamul; JUN, Jong Won; JHUNG, Sung Hwa. Adsorptive removal of methyl orange and methylene blue from aqueous solution with a metal-organic framework material, iron terephthalate (MOF-235). **Journal of Hazard Materials**, v. 185, p. 507–511, 2011.
- HU, Yingli *et al.* Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 793-801, 2018.
- KONKIT, Maytiya; KIM, Wonyong. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 4999-5007, 2016.
- MEHTA, Jyotsana *et al.* Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 322, p. 30-40, 2016.
- OLIVEIRA, Bruno, H. *et al.* Overproduction and properties of lipase by wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 using chicken fat. **Annals of Microbiology**, p. 865-877, 2014.
- PU, Mengjie *et al.* Synthesis of iron-based metal-organic framework MIL-53 as an efficient catalyst to activate persulfate for the degradation of Orange G in aqueous solution. **Applied Catalysis A: General**, v. 549, p. 82-92, 2018.
- WANG, J.; ZHAO, G.; YU, F. Facile preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MOF core-shell microspheres for lipase immobilization. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 69, p. 139–145, dez. 2016.
- WINKLER, Ulrich K.; STUCKMANN, MARTINA. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.
- YAO, Wentao *et al.* A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 743377, 2021.