



Imobilização de lipases em *pellets* biodegradáveis e aplicação na hidrólise de óleos vegetais

Immobilization of lipases in biodegradable pellets and application in the hydrolysis of vegetable oils

Eduardo Candido Milani¹, Patrícia Salomão Garcia²,
Valéria Marta Nascimento³, Alessandra Machado Baron⁴,

RESUMO

As lipases podem ser aplicadas em diversos ramos da indústria, todavia possui alto custo de produção, uma alternativa é realizar a imobilização da lipase em um suporte para permitir sua reutilização e reduzir seu custo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento de pellets contendo amido/PBAT/glicerol e MMT-Na, na imobilização de lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 e aplicação da enzima imobilizada na hidrólise de óleos vegetais. Duas blendas poliméricas foram produzidas sendo a AM-PBAT (2:1) e AM-PBAT-MMT com 5% de MMT-Na. Os suportes foram caracterizados quanto à solubilidade, umidade e grau de intumescimento. A imobilização da lipase foi realizada por adsorção. A eficiência de imobilização e a retenção de atividade foram calculados por meio da atividade lipolítica pelo método da hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). A lipase imobilizada foi aplicada em reações de hidrólise de óleos vegetais. O suporte AM-PBAT-MMT obteve menor solubilidade. A eficiência de imobilização foi 98,7% e 76,5% para AM-PBAT e AM-PBAT-MMT. A retenção de atividade foi de 1028,6% e 925,0% para AM-PBAT-MMT e AM-PBAT respectivamente. A maior atividade de hidrólise de óleos vegetais foi para o óleo de soja para o suporte AM-PBAT-MMT ($5907,3 \pm 297,6 \text{ U g}^{-1}$). Após a imobilização, a enzima sofreu ativação e catalisou principalmente cadeias saturadas e monoinsaturadas de triglicérides. Portanto, os suportes são promissores para a imobilização da lipase.

Palavras-chave: Amido, extrusão, argila, enzima.

ABSTRACT

Lipases can be applied in various branches of industry, however it has a high production cost. Alternative is to immobilize the lipase on a support to allow its reuse and reduce its cost. Therefore, the aim of this work was to investigate the behavior of pellets containing starch/PBAT/glycerol and sodium montmorillonite in the immobilization of lipase from *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 and application of the immobilized enzyme in the hydrolysis of vegetable oils. Two polymeric blends were produced, the AM-PBAT (2:1) and the AM-PBAT-MMT with 5% MMT-Na, both plasticized with glycerol. The substrates were characterized for water solubility (S%), moisture and degree of swelling. Lipase immobilization was performed by adsorption. The immobilization efficiency and activity retention were calculated by means of lipolytic activity with the *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) hydrolysis method. The immobilized lipase was applied in hydrolysis reactions of vegetable oils. The AM-PBAT-MMT support had a lower solubility. The immobilization efficiency was 98,7% and 76,5% for AM-PBAT and AM-PBAT-MMT respectively. Activity retention was 1028,6% and 925,0% for AM-PBAT-MMT and AM-PBAT respectively. The greatest hydrolysis activity of vegetable oils was for soybean oil for the AM-PBAT-MMT support ($5907,3 \pm 297,6 \text{ U g}^{-1}$). After immobilization, the enzyme was activated and catalyzed mainly saturated and monounsaturated triglyceride chains. Therefore, the supports are promising for the immobilization of the lipase.

¹ Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Brasil; eduriqueerick@gmail.com

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; p.salomaogarcia@gmail.com

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, São Paulo, Brasil; valeria@assis.unesp.br

⁴ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Brasil; alessandrab@utfpr.edu.br



Keywords: Starch, extrusion, clay, enzyme.

1 INTRODUÇÃO

As lipases possuem ampla aplicação na catálise de reações da indústria. Elas apresentam vasta funcionalidade desde produção de biodiesel até de fármacos complexos. Na hidrólise de óleos vegetais pode-se citar o tratamento de efluentes com resíduos oleoso, fabricação de agentes tensoativos, sabões, detergentes e na concentração de ácidos graxos poli-insaturados essenciais na alimentação humana. Todavia, as lipases tem elevado custo de produção e purificação, deste modo a imobilização faz-se necessária para possibilitar a sua reutilização. As indústrias vêm buscando materiais de baixo custo e alta eficiência a fim de reduzir os custos gerados pelas etapas anteriores (FERRAZ *et al.* 2018, p.30).

Preocupando-se com os impactos ambientais gerados na produção e descarte dos suportes para imobilização de enzimas, a utilização de materiais de fontes renováveis ou biodegradáveis tem ampla aplicação. A utilização de blendas de amido com outros polímeros como PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade), PP (polipropileno), PS (poliestileno) e PBAT poli(butileno adipato-co-tereftalato), melhorou as características do amido, assim ampliando o uso em reações (BRITO *et al.* 2011, p.127) (GARCIA, 2011, p.1507). A inserção de montmorilonita de sódio também evidenciaram melhoria nas características físicas e mecânicas de suportes (COELHO; MORALES, 2013, p.410).

Tendo em vista as proposições citadas, o objetivo deste trabalho foi de produzir *pellets* biodegradáveis com e sem montmorilonita de sódio e imobilizar lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Além disso os preparados imobilizados foram aplicados na hidrólise de óleos vegetais.

2 MÉTODO

2.1 Produção dos *pellets*

A produção dos *pellets* foi realizada em extrusora mono rosca ((BGM-EL-25, Taboão da Serra, Brasil) com $D = 25$ mm, $L = 26D$, matriz de 6 furos com 2 mm de diâmetro) com perfil de temperatura de 90-120 – 120 – 100 °C, com uma velocidade de 35 rpm. Foram realizadas duas blendas com a base sendo a formulação controle (AM-PBAT) composta por glicerol, amido e PBAT, tendo respectivamente as porcentagens de 15% (v/m), 59,5% (m/m) e 25,5%, e na segunda blenda denominada AM-PBAT-MMT foi adicionado 5% de montmorilonita de sódio em relação aos polímeros. A mistura dos componentes da blenda foi realizada manualmente na seguinte ordem glicerol, MMT/Na, amido e PBAT.

2.2 Umidade

Aproximadamente 2,0 g de *pellets* de cada formulação (AM-PBAT e AM-PBAT-MMT) foram distribuídos em cadinhos de alumínio, em seguida colocados em estufa a 105 °C por aproximadamente 24 h. Após a secagem, as amostras ficaram reservadas no dessecador por 30 minutos, e então foram pesadas em balança analítica. O ensaio foi realizado em triplicata.

A umidade (w%) foi calculada pela Eq. (1):

$$w\% = \frac{M_i - M_s}{M_s} \times 100 \quad (1)$$



Na qual: M_i : massa inicialmente pesada (g); M_s : massa pesada após primeira passagem pela estufa (g).

2.3 Grau de Intumescimento

Em sequência dos procedimentos realizados para a umidade as amostras foram colocadas em béqueres com 20 mL de água destilada e descansaram por 24 h. Após a imersão, os *pellets* foram separados por filtração simples e pesados em balança analítica. O experimento foi realizado em triplicata.

O grau de intumescimento (GI%) foi apurado pela Eq. (2):

$$GI\% = \frac{M_u - M_s}{M_s} \times 100 \quad (2)$$

Na qual: M_u : massa pesada após imersão em água (g).

2.4 Solubilidade

As amostras utilizadas na determinação do GI foram para estufa a 105 °C por aproximadamente 24 h. Após a secagem, as amostras ficaram reservadas no dessecador por 30 minutos, e então foram pesadas em balança analítica para determinar a solubilidade do material. O ensaio foi realizado em triplicata.

A solubilidade (Sw%) foi calculada pela Eq. (3):

$$Sw\% = \frac{M_s - M_{s1}}{M_s} \times 100 \quad (3)$$

Na qual: M_{s1} : massa pesada após segunda passagem pela estufa (g).

2.5 Imobilização de Lipase

Inicialmente colocou-se no Erlenmeyer o suporte (1,0 g), com a enzima (150 mg) e tampão fosfato (50 mL) 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0, para cada composição. Posteriormente levou-se os Erlenmeyers a incubadora *shaker* por 24 h a 120 rpm (25 °C). Posteriormente o suporte foi separado do meio aquoso por peneira, e em seguida levado ao dessecador por 24 h (25 °C), em seguida foi armazenado a 5 °C, e o sobrenadante foi armazenado também a 5 °C. A atividade e a concentração de proteínas, da solução enzimática, foram determinadas antes e após a imobilização pelos métodos do *pNPP* e Bradford (1976).

2.6 Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade das soluções enzimática, antes e após a imobilização e atividade das enzimas imobilizadas, foi utilizado o método de hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila (*pNPP*).

Para a atividade das soluções 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 solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ 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 acompanhada em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) em cubeta de 1 mL por 1 minuto (40°C, 410 nm). As medidas foram realizadas em triplicata.

Para a atividade da enzima imobilizada usou-se 10 mL de meio reacional e 1 mg da enzima imobilizada, a reação ocorreu em Erlenmeyer de 25 mL em banho Maria (40 °C) e retiradas alíquotas a cada minuto, por 3 minutos, para leitura em espectrofotômetro (410 nm). Os ensaios foram realizados em triplicata.



2.7 Eficiência de imobilização (E%) e retenção de atividade (R%)

A eficiência de imobilização (E) foi obtida pela Eq. (4) e a retenção de atividade (R) foi obtida pela Eq. (5):

$$E\% = \frac{(A_{ti} - A_{ts}) \cdot 100}{A_{ti}} \quad (4)$$

$$R\% = \frac{A_0 \cdot 100}{A_T} \quad (5)$$

Em que: A_{ti} : atividade total da solução enzimática antes da imobilização frente *p*NPP (U); A_{ts} : atividade total da solução enzimática após a imobilização (sobrenadante) frente o *p*NPP (U); A_0 : atividade experimental observada da enzima imobilizada (U g⁻¹ de suporte); A_T : atividade teórica da enzima imobilizada (U g⁻¹ de suporte).

A atividade teórica foi calculada através da Eq. (6):

$$A_T = \frac{A_{ti} - A_{ts}}{m} \quad (6)$$

Na qual: m: massa do suporte usada no processo de imobilização.

2.8 Hidrólise de óleos vegetais

As enzimas imobilizadas foram aplicadas na hidrólise de óleo vegetais (soja, milho, girassol e oliva). As atividades foram realizadas conforme o método proposto por Stuer et al. (1986), com modificações. Adicionou-se 5 mL de meio reacional (18 g de óleo, 7 g de triton-X100 e 74 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0) em Erlenmeyer de 125 mL com 5 mg da enzima imobilizada. Em seguida os Erlenmeyer foram para a incubadora *shaker* por 30 minutos a 180 rpm (55 °C). As reações foram interrompidas adicionado-se 16 mL da solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol. Por fim, o meio reacional foi titulado com NaOH 0,1 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácidos graxos livres por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade de hidrólise dos óleos vegetais foi calculada a partir da Eq. 7:

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot M}{E \cdot t} \quad (7)$$

Onde:

V_a : Volume gasto de solução de NaOH para as reações contendo enzima (mL); V_b : Volume gasto de solução de NaOH para o meio reacional sem enzima (branco) (mL); M : Concentração da solução de NaOH (0,05 mol L⁻¹); E : Quantidade de enzima imobilizada (mg); t : Tempo de reação (min).

2.9 Análise estatística: teste de Tukey

A análise estatística foi empregada para verificar diferenças significativas entre amostras durante a caracterização dos *pellets* na análise da atividade lipolítica dos óleos vegetais. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (Tukey, 1953).

3 RESULTADOS



O suporte AM-PBAT- MMT apresentou um menor grau de intumescimento e solubilidade (Tab. 1), essa evidência é corroborada pelo estudo de Novales (2018), onde a inserção da MMT-Na em filmes de quitosana também reduziu a solubilidade dos filmes (19,8 %). A redução desses parâmetros é importante para o trabalho em questão, pois para reações de hidrólise na qual se faz presente água a não degradação do suporte nesse reagente é importante para a durabilidade do suporte.

Tabela 1 - Umidade, solubilidade e grau de intumescimento dos pellets.

Formulação	w%	Sw%	GI%
AM-PBAT	10,52 ± 0,12 ^a	12,77 ± 0,21 ^a	155,49 ± 13,80 ^a
AM-PBAT-MMT	10,61 ± 0,08 ^a	11,98 ± 0,27 ^b	127,74 ± 3,06 ^b

Fonte: Autoria própria (2020)

A eficiência de imobilização é um indicador de quanto da enzima foi imobilizada no suporte. Já a retenção de atividade indica se após a imobilização a enzima ainda terá atividade. Na Tab. 2 evidenciou que se obteve a melhor eficiência de imobilização (98,7%) para o suporte AM-PBAT-MMT. Ainda na Tab. 2 observou-se que ambos os suportes promoveram ativação da enzima após a imobilização, pois a retenção de atividade foi superior a 100%, assim indicando que após a imobilização a enzima sofreu um processo de mudança na conformação que melhorou o contato do sítio ativo da lipase com o substrato. Onde a maior R foi para a composição AM-PBAT com 1028,6%. Obteve-se E% e R% próximos para o estudo de Oliveira (2014) sendo a lipase de *B.lata* LBBIO-BL02 imobilizada em Celite[®], com eficiência de imobilização de 91,5% e retenção de atividade de 768,89%.

Tabela 2 – Eficiência de Imobilização (E%) e Retenção de Atividade (R%)

Formulação	E%	R%
AM-PBAT	76,5	1028,6
AM-PBAT-MMT	98,7	925,0

Fonte: Autoria própria (2021)

A atividade hidrolítica das lipases de *B.lata* imobilizadas foi realizada também em reações de hidrólise em óleos vegetais. Verificou-se pela Tab. 3 que dentro de cada óleo não houve diferença significativa entre suportes utilizados. Mas houve diferenças significativas entre os tipos de óleos, onde se observou a maior atividade para o óleo de soja (5907,3 ± 297,6 U g⁻¹) e menor atividade para o óleo de girassol (315,9 ± 5,8 U g⁻¹). Deste modo indicando uma possível preferência da enzima por cadeias monoinsaturadas conclusão obtida também no estudo de Rodrigues (2019).

Tabela 3 – Atividade hidrolítica da enzima imobilizada nos suportes para diferentes óleos vegetais.

Óleo	Formulação	Atividade (U g ⁻¹)
Soja	AM-PBAT	5841,8 ± 105,2 ^a
	AM-PBAT-MMT	5907,3 ± 297,6 ^a
Milho	AM-PBAT	1140,3 ± 124,6 ^c
	AM-PBAT-MMT	1339,2 ± 65,9 ^c
Girassol	AM-PBAT	315,9 ± 5,8 ^d
	AM-PBAT-MMT	384,7 ± 44,9 ^d
Oliva	AM-PBAT	3746,3 ± 19,2 ^b
	AM-PBAT-MMT	4096,6 ± 40,5 ^b

Fonte: Autoria própria (2021)



4 CONCLUSÃO

A solubilidade e o grau de intumescimento foram reduzidos para a composição AM-PBAT-MMT, característica importante para materiais que serão empregados na imobilização de enzimas e aplicação em reações em meio aquoso. Foi possível imobilizar a lipase de *B. lata* nos pellets biodegradáveis com alta eficiência e ativação após a imobilização. Para a hidrólise dos óleos vegetais, a atividade foi maior para o óleo de soja, indicando uma possível preferência da lipase por ácidos graxos monoinsaturadas.

Então conclui-se que os *pellets* biodegradáveis são promissores para imobilização de lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, sendo necessário, em estudos posteriores, a avaliação da estabilidade em solventes orgânicos, já que as reações podem ocorrer em diversos solventes e a reutilização da enzima imobilizada.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos pelo uso do Laboratório Multiusuários de Apoio a Pesquisa de Apucarana (LAMAP), pelo uso do uso do UV-Vis (Carey).

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, p 54-248, 1976.
- BRITO, G.F, AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO T.J.A. 2011. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, p.127-139, 2011.
- COELHO, P.H.S.L.; MORALES, A.R. Efeito da montmorilonita organifílica na compatibilização e nas propriedades morfológicas, mecânicas e térmicas de blendas de PA6/ PEBD. **Polímeros**. v. 23, p.410-416, 2013.
- FERRAZ, J.L.A.A.; SOUZA, L.O.; SILVA, T.P.; FRANCO, M. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciência Exatas e Naturais**, v. 20, p.30-53, 2018.
- GARCIA, P.S.; GROSSMANN, MVE, YAMASHITA, F, MALI, S, DALL'ANTONIA, LH, BARRETO, W. Citric Acid as multifunctional agent in blowing films of starch/PBAT. **Quim Nova**, v. 34, p. 1507–1510, 2011.
- NOVALES, C.V.M. **Obtenção e caracterização de filmes poliméricos de quitosana com montmorilonita e dapsona para administração cutânea**. Tese (Mestrado de Farmácia) – Universidade Federal de Pernambuco. 73p. 2018.
- OLIVEIRA, B.H.; SANTOS R.É.; LOIOLA L.E.A. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of Burkholderia lata LBBIO-BL02 using chicken fat. **Springer**, 2014.
- RODRIGUES, R.S. **Seleção de Suportes para imobilização de lipases**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana 2019.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular 143 lipase from Pseudomonas aeruginosa. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.
- TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton, NJ: Mimeographs Princeton University, 1953.