



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá  
Brasil

Oliveira de Aguiar, Rafael; Macarini Mondardo, Ramiro; João Agnes, Eduardo; Ferreira de Castro, Heizir; Benedito Pereira, Ernandes

Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados

Acta Scientiarum. Technology, vol. 32, núm. 1, 2010, pp. 15-19

Universidade Estadual de Maringá  
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226525007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados

Rafael Oliveira de Aguiar<sup>1</sup>, Ramiro Macarini Mondardo<sup>1</sup>, Eduardo João Agnes<sup>1</sup>, Heizir Ferreira de Castro<sup>2</sup> e Ernandes Benedito Pereira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e de Resíduos Sólidos e Líquidos, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, 88806-000, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Biocatálise, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: ernandes@unifal-mg.edu.br

**RESUMO.** A hidrólise enzimática de óleos e gorduras ou lipólise é um processo tecnológico que permite a obtenção de ácidos graxos com alto valor agregado e baixo consumo energético. Lipases são enzimas de origem vegetal, animal ou microbiana, que catalisam a hidrólise total ou parcial de óleos e gorduras. Neste estudo, avaliou-se a ação da lipase comercial (pancreatina) na reação de hidrólise do óleo de girassol e de milho, num período de 24h. Foram avaliados os principais parâmetros (pH, tempo, temperatura e concentração do substrato), visando expressar, ao máximo, suas atividades catalíticas. O tempo ideal para melhor expressão enzimática nos dois substratos foi de 5 min. Verificou-se que o pH ótimo nos dois substratos utilizados foi de 7,5. A temperatura ótima foi de 50°C no óleo de girassol e 40°C no óleo de milho. O efeito da concentração do substrato sobre a atividade foi na concentração de 50% para o óleo de girassol e de 30% para o óleo de milho. A melhor produção de ácidos graxos totais foi de 36,52 g L<sup>-1</sup>, utilizando o óleo de girassol e de 29,05 g L<sup>-1</sup>, com o óleo de milho num período de 15h de reação.

**Palavras-chave:** enzimas, ácidos graxos essenciais, hidrólise.

**ABSTRACT.** Evaluation and comparison of the efficiency of detention in chitosan pancreatic lipase for production of fatty acids in flasks under shaking. The enzymatic hydrolysis of oils and fats (or lipolysis) is a technological process that allows the attainment of fatty acids with high aggregate value and low energy consumption. Lipases are enzymes of vegetal, animal or microbial origin that catalyze total or partial hydrolysis of oils and fats. This work had as objective to verify the action of commercial lipase in the hydrolysis reaction of the sunflower oil and corn oil, at time of 24h. Analyses of the main parameters are evaluated (pH, time, temperature and concentration of the substrate), in order to express the maximum of its catalytic activities. The ideal time for better expression of activity in the two substrates was 5 min. It was found that the optimum pH for both substrates was 7.5. The optimum temperature was 50°C in sunflower oil and 40°C in corn oil. The effect of substrate concentration on the activity was at a concentration of 50% for sunflower oil and 30% for corn oil. The best production of total fatty acids was 36.52 g L<sup>-1</sup> using sunflower oil and 29.05 g L<sup>-1</sup> with the corn oil, over a period of 15h of reaction.

**Key words:** enzymes, essential fatty acids, hydrolysis.

## Introdução

A produção mundial anual de óleos e gorduras, estimada em cerca de 90 milhões de toneladas, torna essa classe de materiais importantíssima no contexto econômico internacional (GOMES et al., 2008; GUNSTONE, 1999). Sua maior parte destina-se ao setor alimentício, no entanto, é crescente o interesse de obterem-se produtos químicos de maior valor agregado a partir dessas matérias-primas (CASTRO et al., 2004). A aplicação das enzimas na indústria de óleos e gorduras é imensa e, apesar de já existirem

no mercado algumas preparações enzimáticas bem estabelecidas, os processos enzimáticos ainda não estão suficientemente difundidos nesse segmento industrial. As enzimas podem ser empregadas tanto para a resolução de problemas industriais como para a formação de produtos secundários indesejáveis, na produção de novos tipos de óleos e gorduras. A grande vantagem da utilização de lipase é quanto à sua regioespecificidade, formando um produto de composição química com maior definição aos obtidos por via tradicional. A tecnologia de produção de ácidos graxos com enzimas tem a vantagem de

poder ser conduzida em temperaturas baixas e pressões próximas do normal, o que reduz o consumo de energia e de produtos químicos agressivos ao meio ambiente. As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis, são: a) aproveitar a atividade catalítica por maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo em batelada; b) operar de forma contínua para possibilitar maior controle das variáveis do processo; c) facilitar a separação do catalisador e do produto da reação, no qual, a enzima imobilizada, por estar na forma insolúvel ao meio reacional, é retida no interior do recipiente, e o substrato que não reagiu e o produto, é retirado sem contaminação com o biocatalisador; d) reduzir o volume de reação, pois se tem alta concentração enzimática em menor volume de reator, isto é, alta atividade por unidade de volume, muito superior àquela que seria obtida com a enzima livre. Ainda, pelo fato de o substrato e o produto serem expostos a condições reacionais mais brandas e por menor tempo de reação, previnem-se a ocorrência de reações indesejáveis e a contaminação do meio reacional; alterar, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação à sua forma solúvel, como, por exemplo, conferir maior estabilidade ao pH e à temperatura, reduzir os efeitos de inibição pelo substrato e produto, e facilitar a interrupção do processo reacional, quando se atinge determinado grau de conversão, pela remoção do biocatalisador, se a operação está sendo realizada em batelada (CASTRO; ANDERSON, 1995).

Portanto, o presente estudo objetivou estabelecer um processo enzimático que possibilitasse a produção de ácidos graxos de elevado valor agregado a partir de um substrato de fácil disponibilidade comercial. Para essa finalidade, foi utilizada, como sistema-modelo, a hidrólise de óleo de girassol e milho, catalisada por uma lipase comercial (pancreatina), para a produção dos ácidos graxos essenciais ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6).

## Material e métodos

### Materiais

Neste trabalho foi utilizada uma lipase comercial na forma de pó, de origem animal pancreatina, fornecida pela Kin Master, Estado do Rio Grande do Sul. Como suporte, testou-se a quitosana de grau farmacêutico (Chitosan®), adquirida na Vitalis Farmácia de Manipulação (Criciúma, Estado de Santa Catarina). E como substratos foram usados o azeite de oliva (controle), o óleo de girassol e o óleo de milho,

para a caracterização da lipase livre e imobilizada, adquiridos no comércio local.

Como materiais de partida, utilizaram-se: solventes (acetona, álcool etílico, hexano); sais (fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio); emulsificante (goma arábica em pó) e óleo de oliva virgem com acidez baixa (Carbonell do Brasil Ltda.).

### Equipamentos

Foi utilizado, para medida de pH, potenciômetro (pHmetro), modelo TEC2 (Tecnal) e as dosagens de atividade enzimática foram efetuadas em agitador de Kleine Temporizado (HEMOBLU) com agitação, agitador com aquecimento, modelo Q-261-2 (QUIMIS); estufa, modelo Q-317B242 (QUIMIS); balança analítica, modelo AG 200 (GEHAKA); bomba a vácuo, modelo Q-355D2 (QUIMIS).

### Análises

#### Determinação da atividade hidrolítica em função do tempo

A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 25 mL de azeite de oliva e 25 mL de goma arábica a 7% ( $p\ v^{-1}$ ). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática (5 mg  $mL^{-1}$ ). Os frascos foram incubados a 37°C em diferentes tempos (5, 10, 20 e 30 min.), em estufa termostaticada com agitação (agitador de Kleine). Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando-se fenoltaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade, foi realizado um branco, utilizando-se água destilada. As atividades foram expressas em  $\mu$ moles ( $mg\ min.$ )<sup>-1</sup> (U).

$$U\ (\mu\text{moles}\ (mg\ min.)^{-1}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D \times 10^6}{t \times m} \quad (1)$$

em que:

$D$  = diluição da amostra;

$M$  = concentração da solução de KOH (M);

$m$  = massa de enzima (miligramas);  $t$  = tempo de reação (min.);

$V_a$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

$V_b$  = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL).

#### Teor de ácido graxo

A concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 15 mL de etanol p.a, empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02 M e fenolftaleína como indicador (MACEDO; PASTORE, 1997; MACEDO; MACEDO, 2004). Os cálculos foram efetuados pela equação 2.

$$\text{Ácido graxo (g L}^{-1}\text{)} = \frac{V \times N \times M}{W} \quad (2)$$

em que:

$M$  = massa molecular do ácido graxo titulado (mol);

$N$  = normalidade da solução de KOH;

$V$  = volume gasto de KOH (mL);

$W$  = massa da alíquota titulada (g).

#### Propriedades catalíticas da lipase livre e imobilizada

##### Influência do pH

As atividades das lipases livre e imobilizada foram estudadas, utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 3,0 a 9,0, com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada a metodologia descrita por Soares et al. (1999) variando-se o pH do tampão fosfato de sódio (0,1 M) utilizado na temperatura de 37°C.

##### Influência da Temperatura

Foi verificada influência da temperatura na atividade das lipases livre e imobilizada, empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Soares et al. (1999), nas temperaturas de 30 a 65°C, e pH 7,0.

##### Procedimento de imobilização

Foi adotado o procedimento de imobilização por ligação covalente, empregando-se o glutaraldeído e o metaperiodato de sódio como agentes de ativação, para se comparar a eficiência de imobilização. Também se realizou a imobilização por adsorção física.

##### Ativação do suporte

##### Ativação com glutaraldeído

O suporte foi embebido em solução de glutaraldeído 2,5% ( $v v^{-1}$ ) e em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH na faixa entre 7 e 8, na proporção

sólido/líquido de 1:10, sendo mantido sobre a placa de agitação por 1h. Após esse período, lavou-se o suporte exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, o qual foi, depois, levado à estufa (60°C) por 24h.

##### Ativação com metaperiodato de sódio

Mediante metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), suspendeu-se o suporte em uma solução de 0,5 M de metaperiodato de sódio, em agitação constante durante 90 min., em ambiente isento de claridade. Em seguida, o suporte ativado foi transferido para um funil de Buchner e lavado com água destilada até a neutralidade do filtrado. Após a lavagem, o material foi seco por filtração a vácuo durante 30 min.

##### Imobilização da lipase por ligação covalente e adsorção física

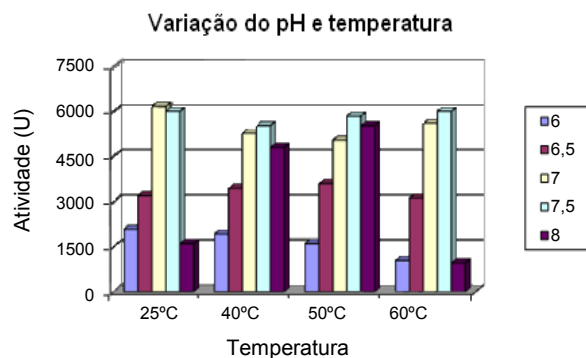
O suporte ativado foi embebido em hexano (1:10) e mantido em agitação durante 2h. Após esse período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na forma livre. O sistema foi mantido em agitação até completa evaporação do hexano. A seguir, o imobilizado foi colocado na estufa, em temperatura de 45°C para total evaporação do hexano, num período de aproximadamente 5h. A fixação da lipase ao suporte efetuou-se em agitação durante 3h, em temperatura ambiente, seguidas por período adicional de 18h em condições estáticas a 4°C. A separação do derivado imobilizado foi executada por filtração a vácuo (papel de filtro, Whatman nº 42), sendo realizadas duas lavagens do complexo suporte-enzima com hexano. A imobilização por ligação covalente realizou-se com os mesmos procedimentos iniciais da adsorção física, diferenciada apenas no estágio pós-ativação, e o suporte foi embebido em solução de glutaraldeído 2,5% por 24h. Após contato suporte-glutaraldeído, seguiram-se as mesmas etapas da adsorção. Determinou-se a atividade hidrolítica do derivado imobilizado pelo método de hidrólise do óleo de milho.

A influência do pH e da temperatura nas atividades das lipases livre e imobilizada foi estudada, utilizando-se a reação de hidrólise faixa de pH entre 6 a 8, nas temperaturas de 25 a 60°C.

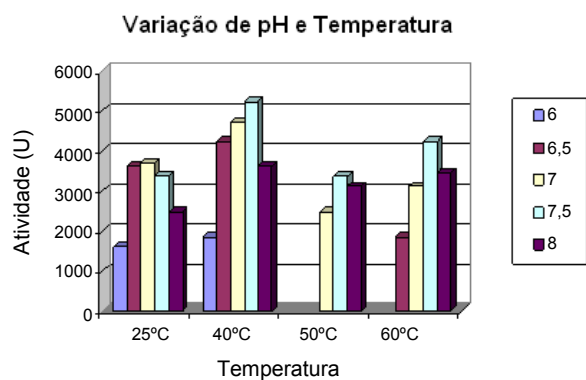
#### Resultados e discussão

Preliminarmente, realizou-se ensaio de atividade enzimática, segundo metodologia descrita anteriormente. O tempo ideal para melhor expressão enzimática nos dois substratos foi de 5 min. nas condições da reação.

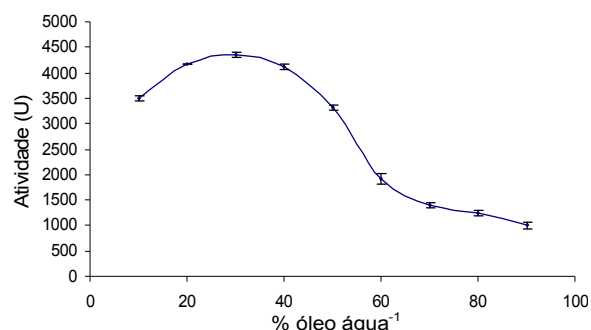
Numa segunda etapa, procedeu-se à caracterização prévia da lipase pancreatina quanto ao pH, à temperatura e concentração do substrato, conforme mostrado nas Figuras 1 a 4. Essa caracterização foi necessária para que se pudesse descobrir sua melhor atuação na reação de hidrólise.



**Figura 1.** Atividade hidrolítica em função do pH e temperatura (óleo de girassol).



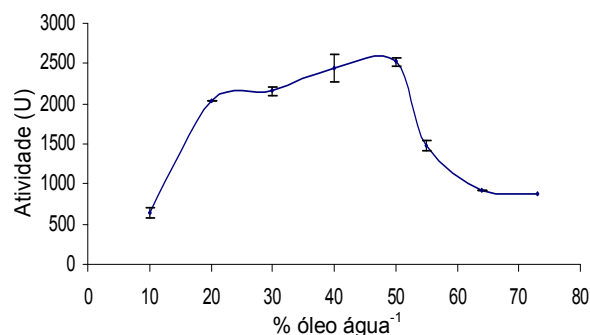
**Figura 2.** Atividade hidrolítica em função do pH e temperatura (óleo de milho).



**Figura 3.** Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de milho).

Os resultados com a enzima livre foram satisfatórios, em que o melhor pH foi de 7,50 para ambos os substratos, enquanto que, na caracterização da temperatura, houve diferença de 10°C entre elas, variando de 40°C para o óleo de milho e 50°C para o óleo de girassol. Na concentração de substrato, a

melhor relação foi de 30% para o óleo de milho e 50% para o óleo de girassol (1:1), como exposto nas Figuras 4 e 5. Observou-se, também, que houve maior atividade quando utilizado o substrato óleo de milho (4.360 U na concentração de 30%) em relação ao óleo de girassol (2.520 U na concentração de 50%).



**Figura 4.** Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de girassol).

Terminada essa etapa, selecionou-se um suporte de custo baixo: a quitosana. Este suporte foi previamente tratado, antes de se iniciar os dois testes de imobilização. Após a imobilização enzimática foram realizados testes em bateladas de 5 min. para se comprovar a atividade da enzima imobilizada no óleo de milho que apresentou uma atividade de 320 unidades.

A quitosana foi o suporte utilizado para imobilização da lipase, previamente tratada em solução tampão, antes de se iniciarem os testes de imobilização por ligação covalente e adsorção física. Após imobilização enzimática, realizaram-se testes em bateladas de 5 min. para se comprovar a atividade da enzima imobilizada no óleo de milho que apresentou uma atividade de 320 unidades.

Os resultados foram relativamente baixos quando comparados com a enzima na sua forma livre (4.500 U), porém, a enzima acoplada ao suporte proporciona maior estabilidade e reprodutibilidade, podendo ser utilizada por maior espaço de tempo para hidrólise dos substratos selecionados (óleo de milho e óleo de girassol).

A enzima imobilizada foi caracterizada novamente e apresentou também resultados satisfatórios, ou seja, temperatura estável ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ),  $\text{pH} = 7,50$ , ficando dentro da faixa reportada na literatura.

## Conclusão

Utilizou-se a lipase Kin Master de produção nacional e estabilizada por meio de imobilização em suporte orgânico (quitosana) a qual, em seguida, foi testada em reatores descontínuos durante 24h, de modo a se investigar o mecanismo e o tipo de

cinética de hidrólise. A melhor produção de ácidos graxos ocorreu no período de 13 às 15h, obtendo-se 36,52 g L<sup>-1</sup> para o óleo de girassol e 29,05 g L<sup>-1</sup> para o óleo de milho, utilizando uma massa de 0,30 g para um volume de 300 mL no óleo de girassol e 0,30 g em um volume de 500 mL no óleo de milho.

### Referências

- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lipase Immobilisation onto polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 6, p. 403-409, 1999.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 16, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- GOMES, L. F. S.; SOUZA, S. N. M.; BARICCATTI, R. A. Biodiesel produzido com óleo de frango. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 57-62, 2008.
- GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p. 1535-1549, 1999.
- MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 7, n. 32, p. 38-46, 2004.
- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 17, p. 115-119, 1997.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, n. 2, p. 745-757, 1999.

*Received on June 30, 2009.*

*Accepted on July 8, 2009.*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.