

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES REGIOSSELETIVAS EM MATRIZES SOL-GEL E REAÇÃO PARCIAL DE HIDRÓLISE

IMMOBILIZATION OF LIPASES REGIOSSELETIVAS DIES IN SOL-GEL AND PARTIAL HYDROLYSIS REACTION

ANDRÉIA FÁTIMA ZANETTE^{1*}, JAMAL AWADALLAK², LÚCIO CARDOZO FILHO³

1. Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, docente da Faculdade de Engenharia e Inovação Técnico Profissional – FEITEP; 2. Doutorando em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Maringá; 3. Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, docente titular do curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

* Rua Iguaçú, 726, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-330. andreiazanette@yahoo.com.br

Recebido em 03/11/2014. Aceito para publicação em 06/11/2014

RESUMO

Óleos vegetais enriquecidos com diacilglicerol possuem características organolépticas semelhantes às dos óleos comestíveis convencionais, com a vantagem de possuírem a tendência de não se acumular no organismo, reduzir os níveis de triacilgliceróis e, como consequência, diminuem a massa corporal e gordura visceral nos humanos, contribuindo para a diminuição da obesidade. Visto que os processos enzimáticos são, em geral, preferidos aos métodos químicos, este trabalho visa imobilizar e encapsular enzimas livres comerciais em matrizes hidrofóbicas sol-gel preparadas a partir de dois precursores, o tetraetilortossilicato (TEOS) e o tetrametoxissilano (TMOS) visando sua utilização na produção de diacilgliceróis a partir do óleo de palma e outros óleos vegetais. Os biocatalisadores foram caracterizados morfológicamente por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), da qual se verificou que o TMOS é o melhor precursor para obtenção de biocatalisadores imobilizados. A eficiência na imobilização das enzimas foi avaliada por meio de uma reação de hidrólise do óleo de palma.

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização, lipases, sol-gel.

ABSTRACT

Diacylglycerol enriched with vegetable oils have organoleptic characteristics similar to those of conventional edible oils, with the advantage of not having the tendency to accumulate in the body, reduce triglyceride levels and as a consequence, decrease body weight and visceral fat in humans, helping to reduce obesity. Whereas the enzymatic processes are generally preferred to chemical methods, this work aims to immobilize and encapsulate commercial free enzymes in hydrophobic sol-gel matrices prepared from two precursors, tetraethylorthosilicate (TEOS) and tetramethoxysilane (TMOS) seeking its use in the production of diglycerides from palm oil and other vegetable

oils. The biocatalysts were morphologically characterized by scanning electron microscopy, from which it is found that the best TMOS precursor for obtaining immobilized biocatalysts electron microscopy. The efficiency of the immobilization of the enzymes was evaluated by a hydrolysis reaction of oil palm.

KEYWORDS: Immobilization, lipases, sol-gel.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos comestíveis são formados basicamente por triacilgliceróis (TAG), sendo composto também por uma pequena quantidade de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG)¹.

Estudos recentes sobre as propriedades nutricionais e efeitos dietéticos dos óleos comestíveis sugerem que a presença de DAGs desempenha um importante papel na redução dos níveis de TAG e, em consequência, diminuem a massa corporal e gordura visceral nos humanos, prevenindo a obesidade e outras doenças relacionadas com o estilo de vida². Os óleos enriquecidos com DAGs não apresentam nenhum efeito genotóxico no organismo humano³.

Eom *et al.* (2010)⁴ investigaram o efeito de DAG sintetizado do óleo de atum no peso corporal e marcadores bioquímicos de plasma na obesidade de camundongos C57BL/6J. O consumo da dieta com DAG em camundongos ocasionou um menor ganho de peso corporal e colesterol plasmático total final, triglicerídeos e anemia quando comparado com um grupo de camundongos ingeriu um alto conteúdo de TAG.

Nos processos químicos para a produção de DAG são utilizadas altas temperaturas (200-250 °C) e pressão, juntamente com catalisadores inorgânicos tais como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou cálcio. Esses

processos, além de exigirem uma alta demanda de energia, geram mudança de coloração e gosto desagradáveis ao produto final⁵.

Devido a essas limitações, os DAGs são preferencialmente obtidos por processos enzimáticos, pois as reações são realizadas em condições brandas, com baixa formação de subprodutos e alta velocidade. Também oferecem vantagens ambientais e redução no consumo de energia, além disso, as lipases apresentam alta seletividade, incluindo seletividade estereoquímica e resultam em produtos de alta pureza e melhor qualidade⁴.

As lipases são enzimas que catalisam reações de esterificação, interesterificação, hidrólise, entre outras. São enzimas altamente seletivas, sendo biocatalisadores aplicáveis à produção de diversos produtos.

Eom *et al.* (2010)⁴ também produziram DAG pela glicerólise com glicerol e óleo de atum utilizando lipases *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e *Candida Antarctica* (Novozyme 435), sendo que a Lipozyme RM IM foi escolhida para a produção de DAG devido a sua alta especificidade verificada através de análise por HPLC.

Watanabe *et al.* (2005)⁶ estudaram a produção de 1,3-diacilglicerol (1,3-DAG) através da esterificação dos ácidos graxos (FA) e glicerol a partir do óleo de soja em biorreator de leito empacotado usando uma lipase Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) 1,3-regiosseletiva (5% em relação à massa de óleo) imobilizada em resina de troca aniônica microporosa. A esterificação foi realizada através da circulação da mistura reacional entre uma coluna de leito empacotado e uma bomba para remoção da água. Obteve-se um rendimento em diacilglicerol em torno de 70% em 3 horas de reação.

As enzimas podem ser adquiridas comercialmente imobilizadas ou pode-se aplicar técnicas de imobilização, tal como citado por Zarcula *et al.* (2010)⁷ que imobilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) pelo método sol-gel utilizando tetrametoxosilano e trimetoxosilano com grupos alquila ou arila como precursores e líquidos iônicos como aditivos para a imobilização, resultando em biocatalisadores com alta eficiência catalítica. A atividade do biocatalisador foi totalmente recuperada depois da imobilização.

Uma das principais propriedades do método sol-gel é reduzir a velocidade de desnaturação das biomoléculas encapsuladas, provavelmente devido à alta reatividade dos precursores capazes de alterar a superfície da proteína, protegendo-as de efeitos desnaturantes, orientando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada no reticulado sol-gel⁸.

O encapsulamento através de sol-gel provou ser uma técnica versátil para a imobilização de uma grande variedade de biomoléculas⁹. Além disso, estudos demonstraram que a atividade da enzima apresenta melhores resultados quando a secagem é realizada em meio super-

crítico, também chamada de secagem por aerogel¹⁰. O material sol-gel oferece baixa resistência difusional, conduzindo a bons resultados em reações de esterificação. A preparação, separação do produto e conservação das propriedades enzimáticas são algumas das vantagens apresentadas por esses sistemas¹¹.

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi imobilizar e encapsular enzimas livres comerciais em matrizes hidrofóbicas sol-gel preparadas a partir de dois precursores, o tetraetilortossilicato (TEOS) e o tetrametoxosilano (TMOS) visando sua utilização na produção de diacilgliceróis a partir do óleo de palma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas as lipases *Rhizopus oryzae* e Amano M adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich. Os suportes foram preparados pela técnica sol-gel, empregando os seguintes precursores: tetraetilortossilicato-TEOS (C₈H₂₀O₄Si), metiltrimetoxosilano-MTOS (C₇H₁₈O₃Si) adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram: heptano PA (Vetec, Brasil), pentano PA (Vetec, Brasil); acetona PA (Merck, Alemanha); etanol comercial; goma arábica em pó, pura (Synth, Brasil). Os reagentes foram utilizados como recebido, sem nenhum tratamento prévio.

O preparo dos biocatalisadores baseou-se nas metodologias descritas por Macario (2009)¹² e Soares (2006)⁸.

Os biocatalisadores imobilizados foram secados utilizando a tecnologia supercrítica (CO₂) a uma temperatura de 40°C para evitar a desnaturação da enzima e a uma pressão de 100 bar por 2 horas.

A caracterização microestrutural dos biocatalisadores imobilizados foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550. Todas as micrografias foram obtidas das superfícies de fratura recobertas com ouro.

As enzimas livres e imobilizadas foram avaliadas por meio da reação de hidrólise parcial dos triglicerídeos. A hidrólise do óleo de palma tem como produtos finais o glicerol e ácidos graxos livres, e como intermediários DAG e MAG, que consistem em TAG sem um ou dois ácidos graxos, respectivamente¹³. As reações foram conduzidas em meio livre de solvente, a 55°C¹⁴, por meio de titulação com solução de hidróxido de sódio. A avaliação das reações nesta etapa foram baseadas na quantificação dos ácidos graxos livres gerados pelo método de titulação, uma vez que a técnica de detecção desse produto é muito mais simples. Os tempos reacionais avaliados foram de 5, 10, 15 e 20 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as micrografias dos biocatalisadores livres (letras A e D) e imobilizados (letras B, C, E, F).

Pode-se observar que a enzima lipase *Rhizopus oryzae* livre (A) possui uma forma geométrica definida, claramente visível. Ao se imobilizar esta enzima com TMOS (B) verificou-se uma estrutura porosa, com uma área superficial muito menor, diferente do ocorrido ao utilizar o precursor TEOS (C), em que a estrutura pareceu rígida, levando a conclusão que apenas o suporte está presente. Analisando estas microscopias verifica-se uma mudança muito grande na estrutura da enzima antes e depois de imobilizada, e não observando a presença da enzima ao utilizar o TEOS como precursor de sílica.

Ao analisar a lipase Amano M livre (D) verifica-se que ela apresenta uma estrutura esponjosa, bastante porosa, que manteve suas características após a imobilização por TMOS (E). Ao utilizar o TEOS (F), novamente verifica-se apenas a presença de uma estrutura rígida, que aparenta ser apenas do suporte.

A análise da atividade hidrolítica das enzimas confirma o que foi observado nas microscopias: as enzimas acabaram perdendo sua conformação inicial, ocasionando na perda da atividade.

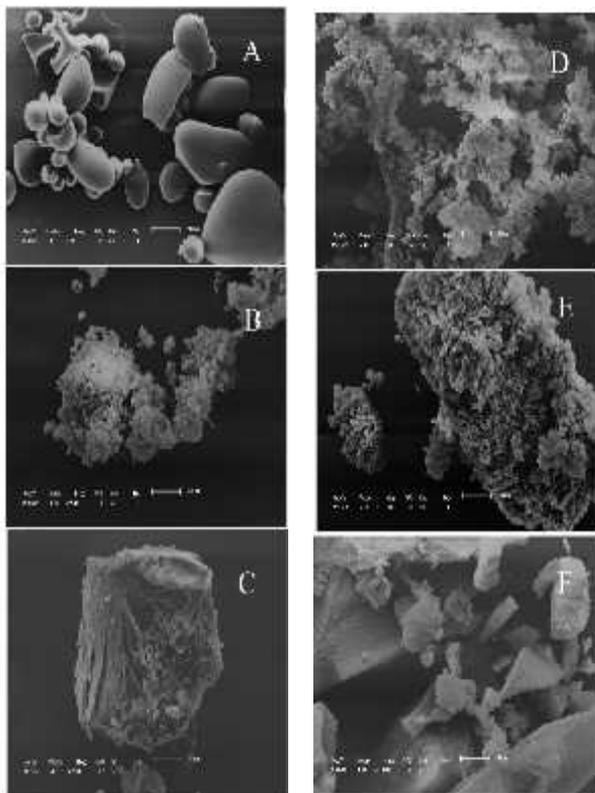


Figura 1. Micrografias eletrônicas dos biocatalisadores: (A) *Rhizopus oryzae* livre (500 X), (B) *Rhizopus oryzae* imobilizada com TMOS (500 X), (C) *Rhizopus oryzae* imobilizada com TEOS (500 X), (D) Amano M livre (1000 X), (E) Amano M imobilizada com TMOS (1000 X), (F) Amano M imobilizada com TEOS (1000 X).

A acidez inicial do óleo de palma foi em torno de 4% e por meio da diminuição da acidez do óleo é possível calcular a atividade das enzimas utilizadas nas reações.

Em geral, as enzimas imobilizadas praticamente não reagiram com 20 minutos de reação, pois a atividade obtida foi próxima a zero, verificado pela não alteração da acidez inicial do óleo de palma.

As enzimas não imobilizadas apresentaram boa atividade catalítica, reduzindo em 15% a acidez inicial do óleo em 5 min de reação.

4. CONCLUSÃO

As técnicas de imobilização de lipases aplicadas neste trabalho apresentaram características distintas. Visivelmente, a técnica que empregou o TEOS não obteve resultados satisfatórios. Já a técnica utilizando o TMOS apresentou uma característica esponjosa, que possivelmente tenha imobilizado parte da enzima. A aplicação da reação de hidrólise parcial do óleo de palma constatou a baixa atividade das enzimas, com o emprego das técnicas utilizadas. Apesar do baixo desempenho nas reações, as técnicas de imobilização de enzimas são importantes aliados na aplicação de enzimas em processos industriais. As vantagens no uso de enzimas imobilizadas incentivam e justificam pesquisas mais detalhadas.

5. FINANCIAMENTO

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- [1] Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill Jr, CG, Amundson CH. "Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A Review", *Journal American Oil Chemist' Society*. 1990; 67:890-910.
- [2] Babicz I, Leite SGF, Souza ROMA, Antunes OAC. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2010; 17:4-6.
- [3] Kasamatsu T, *et al.* Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil, *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43(2):253-60.
- [4] Eom TK, Kong CS, Byun HG, Jung WK, Kim SK. Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. *Process Biochemistry*. 2010; 45:738-43.
- [5] Vu PL, Park RK, Lee YJ, Kim YM, Nam HY, Lee JH, Akoh CC, Lee KT. Two-step production of oil enriched in conjugated linoleic acids and diacylglycerol. *Journal American Oil Chemistry Society*. 2007; 84:123-8.
- [6] Watanabe T, Sugiura M, Sato M, Yamadab N, Nakanishi K. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*. 2005; 40:637-43.
- [7] Zarcula C, Corici L, Croitoru R, Ursoiu A, Peter F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the

- sol-gel method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010; 65:79–86.
- [8] Soares CMF, Santos OA, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006; 39:69–76.
- [9] V.B. Kandimalla, V.S. Tripathi, And H.X. Ju, Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* v. 36, p. 73–106, 2006.
- [10] Pierre A, Buisson P. Influence of the porous texture of silica gels on the enzymatic activity of lipases in esterification reactions, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*. 2001; 11:639-47.
- [11] Soares CMF, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. “Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999; 77-79:745-58.
- [12] Macario A, Moliner M, Corma A, Giordano G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater*. 2009; 118:334-40.
- [13] Rooney D, Weatherley LR. The effect of reactions conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sun flower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochem*. 2001; 36:947-53.
- [14] Voll FAP. Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do Óleo de Palma. Tese de doutorado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá. 2011.

