



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Yarrowia lipolytica* DURANTE A IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL)

RIOS*¹, N.S.; DE MATOS², L.J.B.L.; DA SILVA JÚNIOR³, I.J.; AMARAL⁴, P.F.F.; COELHO⁵, M.A.Z.; GONÇALVES⁶, L.R.B

¹Aluna do DEQ/UFC ²Doutorando do DEQ/UFC ^{3 6}Professor (a) do DEQ/UFC
^{4 5}Professora do DEB/UFRJ

Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Ceará
Endereço – Campus do Pici, Bloco 709 – CEP 60455-760
email: lrg@ufc.br

RESUMO - Lipases são enzimas que podem catalisar reações químicas de alto interesse industrial, como a produção de biodiesel. As enzimas solúveis são muito sensíveis a alterações de temperatura e pH, o que dificulta sua aplicação na indústria. Frente a esta dificuldade, estuda-se a imobilização de enzimas em suportes sólidos. O método de imobilização utilizado foi adsorção física da lipase no suporte, sendo as interações enzima/suporte por meio de ligações fracas, não covalentes. Nesse contexto, foram realizados experimentos para determinar a influência da afinidade enzima/substrato, nas mesmas condições de operação, na determinação dos parâmetros de imobilização. Os substratos testados para a determinação da atividade da enzima foram o p-nitrofenil laurato (pNFL) e azeite de oliva, utilizando uma emulsão preparada com goma arábica. Um estudo a diferentes temperaturas (4°C, 10°C, 25°C, 30°C, 37°C) comparando os substratos foi realizado. Os melhores resultados foram observados na temperatura de 10 °C, para o substrato azeite de oliva (Atividade da enzima imobilizada: 31,43 U/g e Atividade recuperada: 37,41 %). Os parâmetros de imobilização determinado a partir do substrato pNFL foram menores (Atividade da enzima imobilizada: 6,42 U/g e Atividade recuperada: 7,03 %), mostrando que a lipase tem uma maior afinidade pelo substrato azeite de oliva.

Palavras chave: lipase, p-nitrofenil laurato, azeite de oliva.

INTRODUÇÃO

As enzimas atuam como biocatalisadores acelerando reações químicas. Estas possuem uma alta eficiência catalítica, pois a enzima pode acelerar uma reação na ordem de 10^8 a

10^{12} vezes, mantendo uma alta seletividade (Castro *et al.*, 2004). As lipases são enzimas que catalisam reações de elevado interesse industrial, síntese de ésteres na produção do biodiesel.

*Bolsista do PRH-31 da ANP.

As enzimas solúveis são muito sensíveis a alterações de temperatura e pH, o que dificulta sua aplicação na indústria. Neste contexto, estuda-se a imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* em suportes sólidos (Cunha *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2013), empregando alguns métodos de imobilização, tais como adsorção física, ligação covalente, entre outros.

Neste trabalho, o método de imobilização estudado foi a adsorção física da lipase de *Yarrowia lipolytica* em Hidróxido Duplo Lamelar (HDL). O método da adsorção física é de baixo custo, no entanto, as interações enzima/suporte são de natureza fraca, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, entre outras (Brígida *et al.*, 2008).

Neste estudo, a influência da afinidade enzima/substrato, nas mesmas condições de operação, na determinação dos parâmetros de imobilização foi investigada. Os substratos utilizados para a determinação da atividade da enzima foram o p-nitrofenil laurato (pNFL) e azeite de oliva, utilizando uma emulsão preparada com goma arábica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação do Suporte Hidróxido Duplo Lamelar (HDL)

O suporte HDL foi sintetizado pelo método de co-precipitação a pH variável utilizando uma solução aquosa contendo sais de cátions ($Mg(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ e $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) em uma razão molar $Mg/Al = 3:1$. A síntese do material foi de acordo com a metodologia apresentada por Aguiar *et al.*, 2013.

Imobilização Enzimática

A lipase de *Yarrowia lipolytica* foi imobilizada no suporte HDL nas temperaturas (4 °C, 10 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C). A atividade oferecida inicial de enzima foi de 95 U/g. A imobilização foi realizada em presença do tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7. A proporção de imobilização utilizada foi de 1/20 (m/v).

Determinação da atividade hidrolítica da lipase em p-nitrofenil laurato (pNFL)

A atividade da lipase foi determinada através da hidrólise do substrato p-nitrofenil laurato (pNFL), liberando o p-nitrofenol como produto. Dessa forma, foi possível avaliar a atividade da enzima solúvel, do sobrenadante após o processo de imobilização e da enzima imobilizada (At_D). (Rios *et al.*, 2013). A atividade é calculada pela equação 1:

$$At = \frac{C \cdot F \cdot V_r}{V_e \text{ ou } M_d} \quad (1)$$

onde At é a atividade enzimática (U/mL ou U/g), C é a taxa de consumo do pNFL ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$), F é o fator de diluição da solução enzimática, V_r é o volume do reator, V_e é o volume de solução enzimática e M_d a massa de derivado. Para a atividade da enzima imobilizada, foram realizados ensaios em um reator em bancada com 30 mL de pNFL em contato com 0,1 g da lipase adsorvida no suporte. O sistema foi mantido sob agitação a 37 °C e a reação de hidrólise foi monitorada durante 20 minutos.

Determinação da atividade hidrolítica no substrato azeite de oliva emulsionado com goma arábica

A emulsão foi preparada adicionando-se 13,75 g de azeite de oliva e 41,25 g de solução de goma arábica (7 % m/v em água). Posteriormente, 55mL de tampão fosfato de sódio 100mM, pH=7 foram adicionados. A mistura foi vigorosamente agitada a 13000 rpm. A metodologia foi modificada de De Aguiar *et al.* (2010). Os frascos foram incubados a 37 °C, 160 rpm por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi monitorada por 20 minutos. Os ácidos graxos liberados foram mensurados titulando-se KOH 0,025M devidamente padronizado.

A atividade da enzima livre em U/mL e a atividade da enzima imobilizada em U/g foram mensuradas pela equação 2:

$$At = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot F \cdot 1000}{t \cdot V_e} \quad (2)$$

Em que V_a é o volume de KOH titulado, V_b é o volume do branco, M é a molaridade real do KOH, F representa o Fator de Diluição; V_e é o volume de solução enzimática e t é o

tempo de reação. Para a determinação da atividade da enzima imobilizada utiliza-se a equação (II), substituindo o volume da enzima pela massa do derivado.

Parâmetros de Imobilização

Os parâmetros de imobilização foram mensurados de acordo com Silva *et al.*, 2012. O rendimento de imobilização (R) é a quantidade de enzima teoricamente imobilizada. A atividade teórica pode ser calculada utilizando a quantidade de enzima oferecida inicialmente por grama de suporte e o rendimento de imobilização (Silva *et al.*, 2012). A atividade recuperada é mensurada utilizando a atividade da enzima imobilizada. As equações são apresentadas abaixo:

$$\text{Atividade Teórica (At}_T\text{)} = R \cdot CO \quad (3)$$

$$\text{Atividade Recuperada (At}_R\text{)} = \frac{At_D}{At_T} \cdot 100 \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a adsorção da lipase de *Yarrowia lipolytica* no suporte HDL em várias temperaturas, a fim de determinar a condição ideal para o processo. Paralelamente, a atividade hidrolítica da enzima foi mensurada em dois substratos, determinando-se os parâmetros de imobilização.

Os substratos estudados foram o p-nitrofenil laurato (pNFL) e o azeite de oliva em uma emulsão com goma arábica. Os resultados são apresentados nas tabelas 1 e 2, abaixo.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização da lipase medidos com o substrato pNFL.

T (°C)	4 °C	10°C	25°C	30 °C	37 °C
R (%)	86,05	96,09	80,71	99,72	96,41
At _T (U/g)	81,75	91,29	76,68	94,74	91,33
At _D (U/g)	4,69	6,42	4,34	0,00	0,00
At _R (%)	5,75	7,03	5,73	0,00	0,00

Observando os resultados da tabela 1, pode-se afirmar que a melhor temperatura de imobilização foi 10 °C, pois obtiveram-se altos rendimentos de imobilização e a enzima

permaneceu mais ativa após o processo de adsorção (Atividade do derivado: 6,42 U/g).

Tabela 2 – Parâmetros de imobilização da lipase medidos com o substrato azeite de oliva em uma emulsão com goma arábica.

T (°C)	4 °C	10°C	25°C	30 °C	37 °C
R (%)	74,35	88,43	100	100	99,01
At _T (U/g)	70,73	84,02	95	95	94,09
At _D (U/g)	13,12	31,43	14,38	5,47	2,49
At _R (%)	18,58	37,41	15,14	5,76	2,65

Analizando os resultados da tabela 2, pode-se afirmar que a melhor temperatura de imobilização também foi 10 °C. Isso mostra que a variação de substratos não altera o comportamento enzimático. No entanto, a variação de substratos altera a expressão da atividade hidrolítica da enzima de acordo com o grau de afinidade da lipase pelo substrato.

A afinidade de uma lipase em um determinado substrato está relacionada diretamente com a interação deste com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da lipase bem como com o tamanho e formato do mesmo (BRÍGIDA, 2010).

Comparando as tabela 1 e 2, pode-se afirmar que a lipase de *Yarrowia lipolytica* possui maior afinidade pelo substrato azeite de oliva em emulsão com goma arábica. Isso é explicado pelas maiores atividades da enzima imobilizada (At_D) e atividades recuperadas (At_R).

CONCLUSÃO

Constatou-se que a melhor temperatura de imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* foi de 10 °C. O substrato azeite de oliva emulsionado com goma arábica é mais apropriado para medir os parâmetros de imobilização, pois foram obtidos maiores valores de atividades do derivado e recuperada. Isso indica que a enzima estudada tem maior afinidade por este substrato.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. E.; BEZERRA, B. T. C.; BRAGA, B. D. M.; LIMA, P. D. D. S.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; DE LUCENA, S. M. P.; DA SILVA, I. J. (2013) "Adsorption of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solution on Non-Calcined Mg-Al Layered Double Hydroxide: Experimental and Theoretical Study." Separation Science and Technology, v. 48, n. 15, p. 2307-2316.
- BRIGIDA, A. I.; PINHEIRO, A. D.; FERREIRA, A. L.; GONCALVES, L. R. (2008) "Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber". Appl Biochem Biotechnol, v. 146, n. 1-3, p. 173-87.
- BRIGIDA, A. I. S. (2010), Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. Tese. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 197p.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; DOS SANTOS, J.C.; DE AGUIAR, C.L. (2004) "Modificação de óleos e gorduras por biotransformação" Quim. Nova. v. 27, n.1, p. 146-156.
- CUNHA, V. R. R.; DA C. FERREIRA, A. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; TRONTO, J.; VALIM, J. B. (2010) "Layered double hydroxides: Inorganic nanoparticles for storage and release of species of biological and therapeutic interest". Química Nova, v. 33, n. 1, p. 159-171.
- DE AGUIAR, R. O.; MONDARDO, R. M.; AGNES, E. J.; DE CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B. (2010) "Evaluation and comparison of the efficiency of detention in chitosan pancreatic lipase for production of fatty acids in flasks under shaking." Acta Scientiarum. Technology, v. 32, n. 1, p. 15-19.
- RIOS, N. S.; PINHEIRO, B. B.; MATOS, L. J. B. L.; SILVA JR., I. J.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L.R.B. (2013) "Imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* por adsorção: influência do suporte e do tempo de contato" Anais de XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM 2013, 2013, Foz do Iguaçu – PR, v. 1. p. 1-4.
- SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. (2012) "Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies" Biochemical Engineering Journal, v. 60, p. 16-24.
- YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. (2013) "Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids" Bioresour Technol, v. 131, p. 179-87.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o PRH-31 – ANP, PETROBRAS, CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro concedido para a realização do trabalho.