



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

IMPACTO DE TECNOLOGIAS DE ENCAPSULAÇÃO COM BIOPOLÍMEROS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES OBTIDAS DE *Aspergillus niger*

I. M. M. Silva¹, M. A. Alcântara², S.C. Terzi³, A. M. T. M. Cordeiro^{1,2}, L. M. F. Gottshalk³,
A. L. M. Braga¹

1- Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional – CEP: 58055-000 – João Pessoa – PB – Brasil, Telefone: (83) 3209-8222 – e-mail: (ismaelmartins81@gmail.com, atribuzycordeiro@gmail.com, anabraga.ufpb@gmail.com).

2- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP: 58051-900 – João Pessoa – PB – Brasil, Telefone: (83) 98865-4388 — e-mail: (maristelalves@gmail.com)

3- Embrapa Agroindústria de Alimentos. CEP 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9600 – Fax: 55 (21) 3622-9618 – e-mail: (selma.terzi@embrapa.br, leda.fortes@embrapa.br)

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do uso de tecnologias de encapsulação na atividade de lipases. Foram utilizados os extratos enzimáticos de duas cepas: uma selvagem C e outra mutante 11T53A14 do fungo *Aspergillus niger*. Os processos de encapsulação adotados foram a gelificação iônica e a coacervação complexa. Para a determinação de proteína foi utilizado o método de Bradford e a atividade enzimática foi determinada por titulação. As micropartículas foram caracterizadas quanto à eficiência, eficácia e capacidade de carga. Os valores de eficiência, eficácia e capacidade de carga foram 88,53%, 33,59% e 1,84% para as micropartículas por gelificação iônica e 73,89%, 55,69% e 2,87% para as micropartículas por coacervação complexa, respectivamente, para a enzima mutante 11T53A14. A enzima selvagem C apresentou resultados ligeiramente menores. Estas tecnologias tiveram um significativo impacto negativo nas atividades enzimáticas, mais de 50% de redução, provavelmente devido ao grau de secagem da micropartícula.

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the impact of encapsulation technologies on the activity of lipases. Enzymatic extracts were produced from two different *Aspergillus niger* strains, named Wild C and mutant 11T53A14, and encapsulated by alginate ionic gelation and complex coacervation technologies. The enzyme content was considered as protein concentration and determined by the Bradford method, while the enzymatic activity was determined by titration. The microparticles were characterized by their efficiency, efficacy and loading capacity. The results for the mutant enzyme and alginate ionic gels were 88,53%, 33,59% e 1,84%, while for coacervation technology it was 73,89%, 55,69% e 2,87%, respectively, for efficiency, efficacy and loading capacity. The wild C enzyme showed slightly lower results. Those encapsulation Technologies had great negative impact on the enzymes activity, more than 50% reduction, probably due to the high dehydration level of the particles.

PALAVRAS-CHAVE: enzimas, gelificação iônica, coacervação complexa, imobilização.

KEYWORDS: enzymes, ionic gelation, complex coacervation, immobilization.



1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm demonstrado o uso de lipases na modificação de óleos e gorduras, como por exemplo, na obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) e de Lipídeos Estruturados - LEs (Munio et al., 2009; Nunes et al., 2011). As lipases são enzimas hidrolíticas, que em ambientes aquo-restritos são capazes de catalisar diversas reações como esterificação, transesterificação e interesterificação (Sharma et al., 2001). Esta versatilidade da lipase em catalisar diferentes reações é de significativa importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo e para obtenção de novos produtos, como DAGs, MAGs e AGPIs. Segundo Wang et al. (2011), estes compostos reduzem o nível de gordura neutra no sangue, ajudando no combate da obesidade.

Na maioria dos casos, lipases têm sido utilizadas em meios não aquosos, uma vez que estas enzimas atuam na interface óleo-água e especialmente porque seus substratos são tipicamente insolúveis em água. Nesse sentido, estratégias como a otimização de sistemas de solvente, controle de quantidade de água, modificação química ou superficial das lipases, engenharia das proteínas, imobilização de enzimas e *bioimprinting* têm sido usados para melhorar o poder catalítico de lipases em sistemas não aquosos (Akin et al., 2012).

Neste contexto, tecnologias de encapsulação podem ser utilizadas visando um maior rendimento de processo de transformação lipídica. Neste sentido, a coacervação complexa e a gelificação iônica são métodos descritos como bastantes eficazes para a encapsulação de compostos. A coacervação complexa baseia-se na interação eletrostática da combinação de soluções de hidrocolóides com cargas opostas, que causa a precipitação de polímeros complexos, resultando na formação de micropartículas (Shoji et al., 2013). Já a gelificação iônica, ocorre quando uma solução polimérica de alginato de sódio contendo o material núcleo é gotejada sobre uma solução iônica, resultando na formação instantânea de micropartículas que encapsulam compostos dentro de uma rede tridimensional (Vos et al., 2009).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de tecnologias de encapsulação através dos métodos de coacervação complexa e gelificação iônica e o impacto que causam na atividade de lipases em reações lipolíticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados para esta pesquisa foram azeite de oliva, adquirido no comércio de João Pessoa/PB e goma arábica, cloreto de cálcio e alginato de sódio, cedidos pela Funcional Mikron (Brasil); o isolado proteico de soro - WPI (BiPRO whey protein isolate) foi obtido da Davisco Foods International (EUA). Extratos enzimáticos do fungo *Aspergillus niger* foram produzidos pela Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ utilizando duas cepas: uma selvagem C e uma mutante 11T53A14. Tween 80 e demais reagentes químicos apresentaram grau analítico.

2.2 Métodos

Gelificação ionotrópica: Para a formação das micropartículas por gelificação iônica, foi adicionado 1,8% (m/v) de alginato de sódio em pó, sob agitação magnética e em temperatura ambiente, aos extratos enzimáticos líquidos. Em seguida, as micropartículas foram formadas a partir do gotejamento das soluções biopoliméricas utilizando uma seringa de 10 mL e *scalp* com calibre de 27 G (dispositivo de infusão intravenosa) sobre uma solução aquosa de CaCl_2 a 4% (m/v) adicionada de três gotas de Tween 80 sob fraca agitação, com auxílio de um agitador magnético. Os géis recém-



formados ficaram imersos sob agitação na solução de CaCl_2 durante 20 min para completa gelificação. Após este período as micropartículas foram coletadas por filtração e lavadas com água destilada por três vezes para a remoção do excesso de cálcio. As micropartículas produzidas foram colocadas para secar em estufa a 35°C até peso constante

Coacervação complexa: Para a formação das micropartículas por coacervação complexa, inicialmente foi elevado o pH dos extratos enzimáticos para cerca de 6,2 com solução de NaOH a 0,1 M. Em seguida foram solubilizados nos extratos enzimáticos líquidos a proteína do soro e a goma arábica na proporção de 2% (m/v) e 1% (m/v), respectivamente. Após a completa solubilização, foi ajustado o pH da mistura proteína-enzima-polissacarídeo com solução de HCl a 1 M até pH 4,0 para o extrato da enzima selvagem C e até pH 3,5 para o extrato da enzima 11T53A14 para a formação da complexação. O pH de coacervação de cada enzima foi definido em estudos preliminares. Após uma hora, a solução contendo os coacervados foram centrifugados numa rotação de 4500 rpm por 15 min, para completa separação dos coacervados. Após todo o processo, a fase coacervada foi colocada em recipientes de vidro e em seguida para secar em estufa a 35°C até peso constante.

Determinação de proteína: Para a determinação de proteína totais foi adotado o método de Bradford utilizando o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250 como reagente (Bradford, 1976). As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio-padrão.

Determinação da atividade lipolítica: A determinação da atividade lipásica das amostras foi realizada por método titulométrico, conforme descrito por Pereira et al. (2001) com modificações. Utilizou-se tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0. As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio-padrão.

Capacidade de Carga: A capacidade de carga da enzima na micropartícula (%) foi calculada como a massa de enzima na micropartícula por massa de micropartícula conforme a Equação 1.

$$\text{Capacidade de carga (\%)} = \left(\frac{\text{massa de enzima na micropartícula}}{\text{massa de micropartícula}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Eficiência de Encapsulação: A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada através da relação entre a quantidade de enzima encapsulada pela quantidade de enzima total adicionada no processo conforme a Equação 2.

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{massa de enzima encapsulada}}{\text{massa de enzima adicionada}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Eficácia de Encapsulação: A eficácia de encapsulação foi definida como a relação entre a atividade enzimática da lipase encapsulada e a atividade enzimática da lipase livre para uma mesma massa de proteína conforme a Equação 3.

$$\text{Eficácia de encapsulação (\%)} = \left(\frac{A_{\text{encapsulada}}}{A_{\text{livre}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Calorimetria diferencial de varredura (DSC): A análise de calorimetria diferencial de varredura da lipases foi realizada em calorímetro da marca Shimadzu, modelo DSC-60. A massa da amostra foi de 6 mg e a taxa de aquecimento utilizada na análise foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio, iniciando em temperatura ambiente até 200°C .



3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

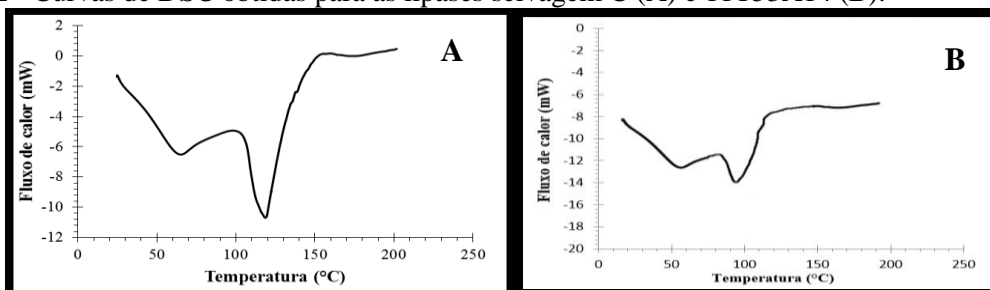
3.1 Caracterização das Enzimas Livres

Concentração de Enzimas no Extrato: A concentração das enzimas foi considerada igual à concentração de proteína nos extratos enzimáticos, a qual foi determinada pelo método de Bradford. Para a enzima Selvagem C obteve-se $0,640 \pm 0,007$ mg/mL enquanto que para a enzima 11T53A14 obteve-se $1,100 \pm 0,055$ mg/ml. Os valores demonstram que o extrato enzimático da enzima 11T53A14 contém maior conteúdo de proteína ou enzima, representando, assim, potencial para melhores rendimentos em processos industriais para este extrato.

Temperatura de Desnaturação da Enzima: A calorimetria diferencial de varredura (DSC) fornece informações vitais sobre a estabilidade de uma proteína ou enzima no desenvolvimento de um processo, através do fornecimento de calor. A DSC mede a entalpia (ΔH) de desdobraimento que resulta da desnaturação induzida pelo calor e as temperaturas de início e término do fenômeno.

Conforme a Figura 1A, a enzima selvagem C apresentou um primeiro pico a $65,10^\circ\text{C}$, que indica sua temperatura de desnaturação, já a enzima 11T53A14 apresentou um primeiro pico a $51,32^\circ\text{C}$ (Figura 1B). A enzima 11T53A14 apresentou um segundo pico próximo de 100°C , que pode estar relacionado à evaporação da água. Um segundo pico também foi observado a 120°C para a enzima selvagem C, que pode ser da decomposição compostos orgânicos, como discutido por Zubiolo et al. (2015). Estes autores observaram três picos de transição endotérmica para a lipase livre, sendo o primeiro em 68°C , o segundo em $206,6^\circ\text{C}$ e o terceiro pico em $370,6^\circ\text{C}$.

Figura 1 - Curvas de DSC obtidas para as lipases selvagem C (A) e 11T53A14 (B).



Fonte: Próprio autor.

Atividade da Enzima livre: A Tabela 1 expressa os resultados obtidos para atividade das lipases Selvagem C e 11T53A14 livres produzidas do fungo *Aspergillus niger* coleção Embrapa – RJ.

Tabela 1 - Valores médios de atividade enzimática das lipases Selvagem C e 11T53A14 livres.

Enzima	Atividade enzimática (U/ml)	Atividade enzimática (U/g de proteína)
Selvagem C	$6,44 \pm 0,00$	$10062,50 \pm 0,00$
11T53A14	$7,00 \pm 0,17$	$6323,40 \pm 0,17$

Fonte: Próprio autor.

Conforme a Tabela 1, apesar da atividade da lipase Selvagem C livre apresentar-se menor que a atividade da lipase 11T53A14 quando os resultados estão expressos em U/ml, quando indicados pela quantidade de proteína presente no extrato enzimático, a lipase Selvagem C apresenta atividade superior em 37,40%. Este fato pode ser explicado devido a menor concentração de proteína, ou seja, de enzima, presente no extrato Selvagem C.



3.2 Encapsulação de Lipase

Os resultados obtidos para a atividade lipolítica das lipases encapsuladas encontram-se na Tabela 2, assim como os de eficiência, eficácia e capacidade de carga de enzima na micropartícula. Para a lipase selvagem C, as micropartículas de alginato produzidas por gelificação iônica apresentaram atividade lipolítica de 2764,54 U/g de proteína, uma boa eficiência de encapsulação, chegando a 86,25%, sendo 27,48% e 1,05% para a eficácia e capacidade de carga de encapsulação, respectivamente. As micropartículas produzidas por coacervação complexa apresentaram atividade de 6618,71 U/g de proteína, 69,06% de eficiência, 65,8% de eficácia e 1,39% de capacidade de carga de encapsulação. Para a lipase 11T53A14, a atividade lipolítica das micropartículas de alginato e coacervação complexa foi 2124,18 e 3521,69 U/g de proteína, respectivamente. Os valores de eficiência, eficácia e capacidade de carga de encapsulação foram 88,53%, 33,59% e 1,84% para as micropartículas por gelificação iônica e 73,89%, 55,69% e 2,87% para as micropartículas por coacervação complexa, respectivamente.

Tabela 2 - Valores médios de atividade, eficiência, eficácia e capacidade de carga de encapsulação das micropartículas secas de gel de alginato e do coacervado referentes a lipase selvagem C e 11T53A14.

Tipo de Enzima	Atividade (U/g de proteína)	Eficiência de encapsulação (%)	Eficácia de encapsulação (%)	Capacidade de Carga (%)
Selvagem C				
Gel Alginato	2764,54 ± 0,21	86,25 ± 0,16	27,48 ± 0,79	1,05 ± 0,03
Coacervado	6618,71 ± 0,31	69,06 ± 0,12	65,8 ± 0,63	1,39 ± 0,04
11T53A14				
Gel Alginato	2124,18 ± 0,17	88,53 ± 0,18	33,59 ± 0,58	1,84 ± 0,02
Coacervado	3521,69 ± 0,14	73,89 ± 0,17	55,69 ± 0,82	2,87 ± 0,05

Fonte: Próprio autor.

A encapsulação por gelificação iônica mostrou-se bastante eficiente para ambas as lipases, no entanto, quando se observa a eficácia de encapsulação, que relaciona a atividade da enzima encapsulada com a atividade da enzima livre para uma mesma massa de proteína, percebe-se que os resultados variaram entre 55-65% para o coacervado e 27-33% para a micropartícula de alginato. Uma explicação para este resultado possivelmente está relacionada a etapa de secagem conforme descreve Lagoa e Rodrigues (2009), que observaram que após a secagem, micropartículas de alginato de cálcio apresentam baixa porosidade, com poros localizados próximos à superfície e núcleo compacto o que pode dificultar os fenômenos de transferência de massa e interferir na atividade final do biocatalisador, e que as micropartículas de alginato de cálcio hidratadas (forma de gel) apresentam estrutura altamente porosa quando observadas por microscopia eletrônica de varredura após preparação da amostra por meio de técnicas especiais que preservam a arquitetura do gel, o que facilita a difusão do substrato no interior do suporte até o contato com a enzima imobilizada, garantindo os altos rendimentos alcançados. Em estudo semelhante, Teixeira (2011) encapsulou lipase AK por gelificação iônica utilizando alginato de sódio e também obteve baixo eficácia de encapsulação, neste caso, todos os seus resultados ficaram abaixo de 10% comparando-se a atividade da lipase livre com a encapsulada, mesmo obtendo 100% de eficiência de encapsulação. Por outro lado, um estudo utilizando a enzima Tanase do fungo *Aspergillus niger* microencapsulada por coacervação complexa relatou que, durante um período de 8h, a enzima imobilizada apresentou rendimento 19,2% superior em relação a enzima livre, o autor relata também que este método não só melhora a transferência de massa, taxas de substratos e produtos, mas também evitou o contato direto da enzima com o solvente, evitando a sua inativação pela toxicidade do solvente, o que não aconteceu com a enzima livre (Yu et al., 2004).



4. CONCLUSÕES

A tecnologia de gelificação iônica mostrou-se bastante eficiente para encapsular a lipase, no entanto, há uma perda significativa na sua atividade, possivelmente relativo à porosidade das micropartículas e ao processo de secagem. A coacervação complexa apresentou melhores resultados para a microencapsulação da lipase, mas perdendo ainda em torno de 50-40% da atividade lipolítica, sendo uma possível tecnologia a ser empregada em caso de reutilização das lipases em processos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, M. S; GÜLER-AKIN, M. B; KIRMACI, H. A; ATASOY, A. F; TÜRKOĞLU, H. The effects of lipase-encapsulating carriers on the accelerated ripening of *Kashar* cheese. **International Journal of Dairy Technology**, 65, 243–249, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemis**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

LAGOA, R; RODRIGUES, J. R. Kinetic analysis of metal uptake by dry and gel alginate particles. **Biochemical Engineering Journal** v. 46. P. 320-326, 2009.

MUNIO, M. M; ROBLES, A; ESTEBAN, L; GONZALEZ, P.A; MOLINA, E. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2- monoacylglycerols. **Process Biochemistry**, v.44, p.723-730, 2009.

NUNES, P. A; PIRES-CABRAL, P; FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalyzed by commercial immobilized lipases. **Food Chemistry**, v.127, p.993-998, 2011.

PEREIRA, E. B; CASTRO, H. F; MORAES, F. F; ZANIN, G. MPEREIRA, E. B. et al. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. **Applied bioch and biotechn**, v. 91, n. 1-9, p. 739-752, 2011.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.627-662, 2001.

SHOJI, A. S; OLIVEIRA, A. C; BALIEIRO, J. C. C; FREITAS, O; THOMAZINI, M; HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 83–88, 2013.

TEIXEIRA, V. F. Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel. 2011. Disponível em:<uenf.br/pos-graduacao/producao-vegetal/files/2014/09/Vânea.pdf> Acesso em: 4 de maio de 2016.

VOS, P; BUCKO, M.; GEMEINER, P.; NAVRÁTIL, M.; STIVEL, J.; FAAS, M.; STRAND, B. L.; SKJAK-BRAEK, G.; MORCH, Y.A.; VIKARTOVSKÁ, A.; LACIK, I.; KOLLÁRIKOVÁ, G.; ORIVE, G; PONCELET, D; PEDRAZ, J. L; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnol. **Biomaterials**, v.30, p.2559-2570, 2009.

WANG, W; LI, T; NING, Z; WANG, Y; YANG, B; YANG, X. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. **Enzyme and Microbial Tech.**, v.49, p.192-196, 2011.

YU, X; LI, Y; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 69-73, 2004.

ZUBIOLO, C; FIGUEIREDO, R. T; SOARES, C. M. F; SANTANA, L. C. L. A. ZUBIOLO, C. Lipase de *Aspergillus niger* obtida de resíduo agroindustrial encapsulada em matriz sol-gel: caracterização morfológica e físico-química. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2802-2809, 2015.