



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

ENCAPSULAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR *Aspergillus Niger* EM GÉIS DE ALGINATO DE SÓDIO

V.S. Galdino¹, A.L.M. Braga¹, F.C.A. Sousa², E.F. Souza³, R.V. Tonon³, L.M.F. Gottschalk³

1- Departamento de Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional – CEP: 58055-000 – João Pessoa – PB – Brasil, Telefone: 55 (83) 3216-7947 – e-mail: (vandilson.santos@gmail.com, anabraga.ufpb@gmail.com)

2- Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Escola de Nutrição, Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- UNIRIO CEP: 22290-240 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil. Telefone: 55 (21) 96733-4442 – e-mail: (aleixo.sousa91@gmail.com)

3- Embrapa Agroindústria de Alimentos. CEP 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9600 – e-mail: (erika.fraga@embrapa.br, renata.tonon@embrapa.br, leda.fortes@embrapa.br)

RESUMO – O consumo elevado de lipídios de baixa qualidade pode trazer sérios danos à saúde, e uma alternativa para a melhoria destes é o desenvolvimento de óleos com propriedades funcionais através da interesterificação utilizando lipases. A encapsulação é um método utilizado para melhorar o poder catalítico das lipases, podendo afetar sua atividade e estabilidade, alterando sua reutilização e viabilidade industrial. O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar o impacto do método de encapsulação por gelificação ionotrópica na atividade enzimática de lipases produzidas por *Aspergillus niger*. A gelificação das enzimas com alginato foi eficiente e demonstrou *loading*, eficiência e eficácia de encapsulação com valores de 1,17%, 72,2% e 88% respectivamente. Os géis apresentaram alta estabilidade mecânica com baixo vazamento de enzima através da camada de membrana polimérica. Concluiu-se que a gelificação ionotrópica não teve impactos negativos na atividade de lipases, sendo possível utilizar esse método mantendo as funções fundamentais dessas lipases.

ABSTRACT – The high consumption of low quality lipids can cause serious health injuries. An alternative to improve lipids is the development of functional oils by interesterification utilizing lipases. Encapsulation is a method for improving the catalytic power of lipases, which may affect their activity and stability by changing its reuse and industrial viability. Therefore, the objective of this study was to assess the impact of the encapsulation by ionotropic gelation method in the enzymatic activity of lipases produced by *Aspergillus niger*. The alginate gelation of enzymes was efficient and demonstrated loading, efficiency and effectiveness of encapsulation with values of 1.17%, 72.2% and 88% respectively. The gels showed high mechanical stability with low enzyme leakage through the polymer layer. Given these points, the ionotropic gelation had no negative impact on lipase activity, and thus this method can be used maintaining the basic functions of these lipases.

PALAVRAS-CHAVE: encapsulação; lipases; gelificação ionotrópica.

KEYWORDS: encapsulation; lipases; ionotropic gelation.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2011) há 500 milhões de obesos no mundo e, destes, um terço está nos países em desenvolvimento. Com o objetivo de combater a obesidade, diversos estudos mencionavam que uma dieta com baixo teor de gordura seria o caminho para uma vida saudável. Entretanto, pesquisas vêm mostrando que dietas com baixo teor de gordura, tendem a não satisfazer a fome e podem alterar a produção e liberação de hormônios, diminuindo o metabolismo



de uma forma geral, favorecendo o acúmulo de gordura. Além disso, óleos e gorduras são essenciais em diversas funções, como controle de insulina, desenvolvimento do cérebro e nervos, sistema imunológico e atividades anti-inflamatórias, dentre outras. Também agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K1 e são fontes de ácidos graxos (AGs) essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico (CLAUSS, 1996).

A valorização de óleos de baixo custo, por meio da interesterificação utilizando lipases, e o desenvolvimento de óleos com propriedades funcionais, que impeçam o aumento de gordura no corpo, especialmente gordura que se deposita nos órgãos internos, têm sido estudados. O ingrediente principal destes óleos é o diacilglicerol (DAG), produzido enzimaticamente a partir de óleo natural. O DAG é digerido e absorvido no intestino delgado, sendo consumido como energia, sem voltar a sintetizar a gordura neutra, como acontece com os azeites convencionais. Em consequência, reduz o nível de gordura neutra no sangue, ajudando no combate da obesidade.

Diversos estudos têm mostrado 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. A lipase modificada pode ter sua atividade e estabilidade aumentada, facilitando sua reutilização, viabilizando seu uso industrial.

Neste contexto, tecnologias de encapsulação podem ser utilizadas visando um maior rendimento de processo de transformação lipídica ou o controle da atuação enzimática no próprio alimento ou durante o preparo deste. ARAVINDAN et al. (2007) fizeram uma revisão sobre a aplicação de lipases em diversos tipos de indústrias de alimentos, destacando que essas enzimas podem ser utilizadas no processamento de lácteos, panificação e alimentos funcionais. Recentemente, AKIN et al. (2012) desenvolveram lipases microencapsuladas em géis de biopolímeros produzidos por extrusão/gelificação iônica para acelerar o processo de maturação de queijo.

O objetivo do trabalho foi, portanto, encapsular e avaliar os impactos da encapsulação sobre a atividade enzimática de lipases produzidas por *Aspergillus niger*. As lipases foram encapsuladas pelo processo de extrusão com gelificação iônica e em seguida analisadas de acordo com sua atividade enzimática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os polissacarídeos e proteínas utilizados no processo de encapsulação por gelificação ionotrópica foram alginato e proteínas globulares do soro do leite. Estes biopolímeros foram gentilmente doados pela Funcional Mikron, SP (Brasil). As enzimas foram produzidas na Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ. As seringas e os *scalps* descartáveis utilizados para extrusão foram adquiridos no comércio local.

2.2 Métodos

Enzimas: Os extratos enzimáticos lipolíticos foram produzidos por fermentação em estado sólido pelos fungos *Aspergillus niger* 11T53A14 e *Aspergillus niger* C. Os experimentos foram conduzidos em bandejas, incubadas em câmara BOD a 32°C por até 72 horas em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono. A enzima foi extraída com adição de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e o extrato enzimático bruto foi obtido após filtração com papel de filtro seguido de filtração em membrana de microfiltração para posterior determinação das atividades enzimáticas.

Soluções: Foram utilizadas soluções de alginato em água a 1%, 1,5%, 2,0% p/p, solução de cloreto de cálcio a 4% p/p, solução de proteína desnaturada (10% p/p) obtida por diluição da proteína do soro de leite em água destilada usando agitador, elevando-se a temperatura a 80°C durante 15



minutos para a desnaturação das proteínas e posterior resfriamento. Após o preparo, as soluções foram acondicionadas em recipientes de vidro. Para o preparo da solução de alginato (1,8%) e enzimas, o pó foi completamente solubilizado no extrato enzimático líquido, sem adição de água.

Gelificação ionotrópica: As partículas de géis (1 mm) foram formadas a partir do gotejamento das soluções biopoliméricas sobre uma solução aquosa de 4% (m/m) CaCl_2 sob fraca agitação. Após os primeiros experimentos, foi definida como 4% a concentração mínima para a solução salina, de forma que os géis fossem formados antes que ocorresse a dissolução do biopolímero no banho salino.

O gotejamento foi realizado utilizando-se seringas descartáveis de 10 mL, acopladas a *scalps* descartáveis (dispositivo de infusão intra-venosa) de calibres 27G e 19G respectivamente. Esses dois calibres foram utilizados para produzir géis maiores que 500 μm . Em todos os casos, o cloreto de cálcio atuou como gelificante do polissacarídeo. A altura entre a produção de gota e o banho gelificante foi de 10 cm. É importante ressaltar que essas medidas foram bastante superiores à altura mínima de 55 mm para formação da gota proposta por Aliseda et al (2008). As medidas utilizadas no presente trabalho foram determinadas de forma experimental, a fim de obter partículas mais esféricas possíveis. Também para esse fim, surfactante Polisorbato 80 (Tween 80) foi adicionado à solução salina para diminuir a tensão superficial e facilitar a penetração da emulsão-gota na solução.

Os géis recém-formados ficaram imersos sob agitação na solução de CaCl_2 durante 30 min para completa gelificação. Após este período os géis foram coletados por filtração e lavados com 2 litros de água destilada para cada 100g de gel, a fim de remover o excesso de cálcio residual. Para os géis contendo enzima imobilizada foi realizada também uma lavagem com solução tampão Fosfato de Sódio 50 mM pH 7 para remover traços de enzimas não imobilizadas.

Métodos analíticos:

A determinação de concentração proteica antes e depois da encapsulação foi determinada pelo procedimento descrito por Lowry (1951), modificado por Hartree (1972), utilizando Albumina de Soro Bovino. A atividade enzimática tanto da enzima livre quanto imobilizada foi determinada por hidrólise de p-nitrofenil butirato. Foi utilizada a metodologia descrita por Cunha et al (2008), utilizando como substrato padrão o p-nitrofenil butirato. Estudos prévios indicaram alta especificidade das enzimas utilizadas para o substrato mencionado. A reação de hidrólise de p-nitrofenil butirato (400 μM) catalisada pela enzima livre ocorreu em tampão fosfato de sódio a 25 mM e pH 7, sob agitação, a 28°C. Em 2,5 mL de substrato, foram adicionados 0,1 mL de solução da enzima. A reação foi monitorada por espectrofotômetro da marca Ciencor Scientific UV-VIS SÉRIE UV-6 a 410 nm, segundo descrito por Brigida (2010).

Cálculos: O *loading* de encapsulação (%) foi calculado como a quantidade de enzima encapsulada por grama de cápsula, conforme a Equação 1.

$$\text{Loading (\%)} = 100 * \frac{\text{enzima encapsulada (g)}}{\text{geis (g)}} \quad \text{Eq. 1}$$

A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada conforme a Equação 2, onde C_i é a concentração de proteína inicial na mistura Alginato / extrato enzimático (mg/mL), V_i (mL) é o volume inicial desta mistura que foi adicionado ao banho salino, C_f (mg/mL) é a concentração de proteína final do banho salino e V_f (mL) é o volume total do banho salino.

$$\text{EE (\%)} = 100 * \frac{C_i * V_i - C_f * V_f}{C_i * V_i} \quad \text{Eq. 2}$$

A eficácia de encapsulação (%) pode ser definida como a relação entre a atividade enzimática da lipase encapsulada e a atividade enzimática da lipase livre para uma mesma massa de proteína (Equação 3), onde, $A_{\text{encapsulada}}$ é a atividade da enzima encapsulada, e A_{livre} é a atividade da enzima livre.



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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio são parâmetros críticos para a encapsulação da enzima em géis biopoliméricos, devido à reação de gelificação pela interação entre o alginato e os íons de Ca^{2+} . Das diferentes concentrações de alginato (1%, 1,5%, 2%) testadas, todas formaram microgéis por gotejamento, a concentração de 1,5% apresentou a formação de géis mais regulares. Dessa forma, com base nos resultados verificou-se que concentrações de alginato a 1,5 seria a formulação mais indicada para formação de géis através do método de gotejamento.

Em relação à enzima utilizada, trabalhou-se com a cepa *Selvagem C* de lipases produzidas por *Aspergillus niger* da coleção Embrapa (RJ). Essas enzimas demonstraram atividade enzimática superior às demais enzimas da mesma coleção, a qual foi constatada após diversas análises de atividade enzimática. Na tabela 1 estão mostrados os resultados da análise de atividade enzimática com três extratos diferentes.

Tabela 1 – Atividade enzimática dos três extratos de *Aspergillus niger* produzidos pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ).

Enzima	delta (abs/t)	Va (mL)	Vr (mL)	Atividade Enzimática (U/L)
Mutante 11T53A14	0,035	0,1	2,1	81,1 ± 4, 8
Mutante 11T53A14	0,02	0,1	2,1	45,9 ± 4,6
Selvagem C	0,039	0,1	2,1	91,0 ± 16,9

Os géis formados apresentaram homogeneidade de tamanho quando ainda hidratados, sendo a média de 1.7 mm para as partículas extrusadas por *scalp* de calibre pequeno e 2.3 mm para as extrusadas por calibre médio. É importante mencionar que os géis foram utilizados frescos, isto é, não foram submetidos a qualquer processo de secagem.

A Tabela 2 compara os valores da atividade enzimática da enzima selvagem C não-encapsulada e os valores da atividade enzimática após a encapsulação.

Tabela 2 – Atividade enzimática da enzima *Selvagem C* não-encapsulada e encapsulada em gel biopolimérico.

Enzima	Atividade Enzimática (U/L)
Selvagem C não-encapsulada	91,0 ± 16,9
Selvagem C encapsulada	80,1 ± 4,4

A partir da análise de atividade enzimática em substrato padrão, em comparação com as atividades da enzima livre, a enzima encapsulada demonstrou não apresentar diferença significativa. A ligeira redução de atividade pode ser explicada tanto pelo fato do material de parede influir no efeito difusional do substrato através do gel, bem como das temperaturas utilizadas em ambas análises. A



análise da enzima livre foi realizada com o substrato fenílico a 37°C, enquanto a análise da enzima encapsulada foi conduzida à temperatura ambiente, o que pode ter alterado significativamente a atividade enzimática e seu desempenho hidrolítico, uma vez que a temperatura ótima para essas enzimas é de aproximadamente 37° C.

O *loading*, a eficiência e eficácia de encapsulação foram calculados a partir das Equações 1, 2, e 3, os valores encontrados foram 1,17%, 72,2% e 88% respectivamente. Os géis de alginato demonstraram alta estabilidade mecânica com baixo vazamento de enzima através da camada de membrana polimérica. Isso pôde ser avaliado a partir da concentração de proteína no sobrenadante de cloreto de cálcio filtrado, a qual foi de 1.33 mg/mL, em comparação com o extrato enzimático que foi de 16.10 mg/L. No entanto, ainda houve certa perda de enzima, o que ocorreu provavelmente devido a estrutura porosa que forma o alginato, de acordo com os relatos de Cao (2006) e Degroot (2001). Com a finalidade de resolver este problema, é necessário o estudo com diferentes formulações para o material de parede dos microgeis.

4. CONCLUSÃO

A encapsulação de lipases produzidas por *Aspergillus niger* pelo método de gelificação ionotrópica é possível sem que haja grande redução da atividade enzimática. Espera-se que esses géis possam ser utilizados e reutilizados para conversão de óleos de baixa qualidade em óleos nutricionais ou biodiesel. Contudo, fazem-se necessários estudos posteriores a respeito do reciclo dos géis, bem como do efeito difusional do substrato na matriz polimérica quando aplicados em material lipídico.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Embrapa Agroindústria de Alimentos, Funcional Mikron e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akın, M.S., Güler-Akın, M.B., Kırmacı, H.A., Atasoy, A.F. & Türkoğlu, H. (2012). The effects of lipase-encapsulating carriers on the accelerated ripening of Kashar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2), 243-249.
- Aliseda, A., Hopfinger, E.J., Lasheras, J.C., Kremer, D.M., Berchielli, A., & Connolly, E.K. (2008). Atomization of viscous and non-newtonian liquids by a coaxial, high-speed gas jet. Experiments and droplet size modeling. *International Journal of Multiphase Flow*, 34(2), 161-175.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, 6(2), 141-158.
- Brigida, A.I.S. (2010). *Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicação industriais* (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Clauss, J. (1996). Interesterificação de óleo de palma. *Óleos & Grãos*, 5(28), 31-37.
- Cao, L., & Schmid, R. (2006). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Germany: Wiley.
- Degroot, A.R., & Neufeld, R.J. (2001). Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6-7), 321-327.
- Lowry, O.H., Rosebrouh, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Hartree, E.E. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48(2), 422-427.



Munio, M.M., Robles, A., Esteban, L., Gonzalez, P.A., & Molina, E. (2009). Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochemistry*, 44(7), 723-730.

Nunes, P.A., Pires-Cabral, P., Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalyzed by commercial immobilized lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993-998.