

Immobilization of lipase in pectin extracted from lobeira fruit (*Solanum lycocarpum* St. Hil.)

Imobilização de lipase em pectina extraída de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.)

Rômulo Roosevelt da Silva Filho¹, Daniela Fernandes Torralbo², Maria Carolina B. Di-Medeiros³, Karla de Aleluia Batista⁴ e Kátia Flávia Fernandes*

ABSTRACT

In this study, pectin extracted from the lobeira fruit (*Solanum lycocarpum* St. Hil) was used as support for lipase immobilization. The lobeira fruits were dried and the flour was used for pectin extraction. A 2³ factorial design was used for the extraction process, with temperature, pH and extraction time as independent variables. Immobilization was performed by adsorption and covalent bonding using sodium periodate (PEC - P) or glutaraldehyde (PEC - G) as support activators. The results indicated that covalent bonding PEC - P was efficient in immobilizing the enzyme. The immobilization by adsorption and covalent bonding PEC - G did not provide storage stability. The stability tests results for the storage of the lipase-PEC-P system demonstrated that this system maintained 85,4% of enzyme activity after eleven weeks of storage. These results enable the use of pectin extracted from the *Solanum lycocarpum* (St. Hil.) fruit as a promising support for the immobilization of enzymes.

Key words: pectin, immobilization, *Solanum lycocarpum*, lipase.

RESUMO

Neste trabalho, pectina extraída de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) foi utilizada como suporte para a imobilização de lipase. Os frutos de lobeira foram secos e a farinha utilizada para a extração da pectina. Para o processo de extração foi utilizado um planejamento fatorial 2³ com temperatura, pH e tempo como variáveis independentes. A imobilização foi realizada por adsorção e por ligação covalente utilizando periodato de sódio (PEC-P) ou glutaraldeído (PEC-G) como ativadores do suporte. Os resultados indicaram que a ativação por PEC-P foi eficiente para a imobilização da enzima. A imobilização por adsorção e por ligação covalente para o suporte PEC-G não apresentaram estabilidade ao armazenamento. Os resultados para os testes de estabilidade ao armazenamento do sistema lipase-PEC-P demonstraram que este sistema manteve 85,4% da atividade enzimática após onze semanas de estocagem. Estes resultados habilitam a utilização da pectina extraída de lobeira como um suporte promissor para a imobilização de enzimas.

Palavras-chave: pectina, imobilização, *Solanum lycocarpum*, lipase.

¹ doctoroosevelt@hotmail.com;

² danielatorralbo@gmail.com;

³ carol-quimica-ufg@bol.com.br;

⁴ karla-batista@hotmail.com;

* kfernandes.lqp@gmail.com (autor para correspondência).

Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

A lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) é uma planta da família das solanáceas, muito abundante no cerrado. A árvore pode atingir até quatro metros de altura e apresenta plena capacidade de crescimento em condições ambientais desfavoráveis, como terras ácidas e pobres em nutrientes e até as recorrentes queimadas, o que gera a hipótese de que os polissacarídeos estruturais presentes nessa espécie, assim como em outros vegetais desse bioma, são altamente estáveis (CORRÊA *et al.*, 2000; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2003). Nestas condições de adversidade a lobeira produz frutos de julho a janeiro com massa variando entre 400 e 900 g (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2003). Em trabalho preliminar, Corrêa *et al.* (2000) propuseram que a polpa destes frutos poderia ser fonte de substâncias pectínicas.

Pectinas são polissacarídeos que desempenham função estrutural nas plantas, compondo majoritariamente as lamelas médias de células vegetais jovens (ALKORTA *et al.*, 1998). São compostos por uma cadeia principal de unidades de ácido galacturônico que pode apresentar metilações e acetilações. O polissacarídeo pode apresentar maior ou menor grau de ramificações contendo diversos outros oligossacarídeos (ALKORTA *et al.*, 1998; WILLATS *et al.*, 2006). Pectinas estão entre os polissacarídeos mais estudados nos dias atuais, sendo alvo de diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos por sua ação como agentes gelificantes, emulsificantes, estabilizantes em bebidas lácteas e como componentes em massas de panificação (TORRALBO *et al.*, WILLATS *et al.*, 2006). Por outro lado, novas abordagens funcionais e estruturais têm sido pesquisadas para pectinas, de modo a explorar o potencial biotecnológico dessas moléculas.

Lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam acil-gliceróis, em ácidos graxos (moléculas anfipáticas) e glicerol e podem ainda, catalisar reações de transesterificação. Lipases são muito visadas na indústria, sobretudo na indústria alimentícia, para atuarem na maturação de laticínios, produção de ésteres aromatizantes, glicerol, entre outras aplicações (SHARMA *et al.*, 2001). Um aspecto interessante da catálise *in vitro* produzida por lipases é a necessidade da presença de um agente estabilizante, uma vez que esta se processa na interface entre os ambientes hidrofílicos, onde a enzima se encontra dissolvida, e o hidrofóbico, onde se encontra o lipídeo substrato. Outro fator a ser destacado é que lipases, assim como a maioria das enzimas, apresentam

uma estabilidade limitada, o que representa um componente importante na composição do custo dos produtos gerados. Assim, imobilizar a lipase pode ser uma estratégia muito interessante, uma vez que a principal característica das enzimas imobilizadas é o aumento de sua estabilidade, além é claro, da possibilidade de uso repetido que a imobilização possibilita (SILVA *et al.*, 2010; CARAMORI; FERNANDES, 2008; FERNANDES *et al.*, 2005).

Sob essa perspectiva, o estudo em questão utilizou pectina de frutos de lobeira como matriz para imobilização de lipase, avaliando o efeito da imobilização na atividade catalítica da enzima e em sua estabilidade em armazenamento sob refrigeração ao longo do tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e produção da farinha de *Solanum lycocarpum*

Frutos verdes de *S. lycocarpum* foram coletados no campus da Universidade Federal de Goiás. Os frutos foram higienizados, decorticados e a polpa foi seca em estufa de circulação forçada a 60 °C até peso constante. Em seguida a polpa seca foi moída em moinho analítico, peneirada em tamis com abertura de 0,425 mm, acondicionada em frascos de polietileno e armazenadas a 4 °C até o uso.

2. Extração da pectina

A extração da pectina de *S. lycocarpum* foi feita de acordo com metodologia adaptada de Pagán (1999), utilizando planejamento fatorial 2³ (Tabela 1) tendo como variáveis independentes pH, temperatura e tempo de extração. A pectina extraída foi precipitada por adição de 2 volumes de etanol absoluto seguido de armazenamento por 24 h sob refrigeração. O material precipitado foi centrifugado a 10000 rpm por 20 min em centrífuga refrigerada. O precipitado, denominado pectina bruta (PEC), foi seco, triturado e armazenado em geladeira até a realização das análises.

Tabela 1. Matrix do delineamento experimental para extração de pectina.

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH	Rendimento de extração (%)
1	40 (-)	30 (-)	1 (-)	5,27
2	80 (+)	30 (-)	1 (-)	33,68
3	40 (-)	90 (+)	1 (-)	10,41
4	80 (+)	90 (+)	1 (-)	26,34
5	40 (-)	30 (-)	3 (+)	5,38

continua

continuação

6	80 (+)	30 (-)	3 (+)	8,22
7	40 (-)	90 (+)	3 (+)	4,16
8	80 (+)	90 (+)	3 (+)	5,62

3. Imobilização de lipase

A PEC extraída foi utilizada como suporte para imobilização de lipase por ligação covalente e por adsorção. Nos testes de imobilização por ligação covalente foram testados periodato de sódio e glutaraldeído como ativadores. Para a ativação da pectina por periodato (PEC-P), 5,0 mg de pectina bruta de lobeira foram solubilizados em 10 mL de solução de periodato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, incubados por 12 h, em temperatura ambiente. Na ativação por glutaraldeído (PEC-G), 5,0 mg de PEC foram misturadas a 2,0 mL de glutaraldeído 5% (v/v) seguida de agitação por 30 min, em temperatura ambiente. Após reação de ativação a pectina foi precipitada pela adição de 2 volumes de etanol gelado, centrifugada, seca e usada para imobilização de lipase. A imobilização foi feita adicionando-se a 5,0 mg de PEC-P ou PEC-G em volumes crescentes (25 μL a 2,0 mL) de solução de Lipolase® apresentando 1714 UE e 16,14 mg de proteína diluída em tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, na proporção de 1:400. O volume final foi completado para 3,0 mL com tampão Tris e o sistema incubado por 30 min a 4 °C, sob agitação. Por fim, o material foi precipitado com etanol e centrifugado para a recuperação dos sistemas PEC-P-lipase e PEC-G-lipase (Silva *et al.*, 2010).

Nos testes de imobilização por adsorção, volumes crescentes (200 μL a 2,0 mL) de solução de lipase diluída em tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, na proporção 1:400 foram adicionados a 5,0 mg de pectina. O volume final foi completado para 3,0 mL com tampão Tris e o sistema foi submetido a agitação, precipitação com etanol e centrifugação, como descrito acima. O sistema resultante foi nomeado PEC-lipase.

4. Determinação da atividade enzimática da enzima livre e imobilizada

A análise da atividade enzimática da lipase livre e imobilizada foi realizada de acordo com metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979), utilizando p-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de lipase capaz de produzir 1,0 mmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

5. Estabilidade durante armazenamento e testes de uso repetido

Para os testes de estabilidade durante armazenamento, 10 mg de PEC-P-lipase, 10 mg de PEC-G-lipase e 10 mg de PEC-lipase, foram armazenadas em 1,0 mL de etanol por 11 semanas, a 4 °C. Os sistemas armazenados em etanol foram avaliados quanto à capacidade de reuso ao longo do tempo de armazenamento. Para os ensaios da atividade enzimática as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min e o precipitado utilizado na determinação da atividade enzimática conforme descrito no item 4.

6. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata, com no mínimo três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação das médias, utilizando nível de significância de 0,05. O programa utilizado para a análise dos dados foi o Statistica 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração da Pectina:

Utilizando planejamento fatorial foi possível verificar que todos os fatores interferiram significativamente no rendimento da extração. Como pode ser observado na Figura 1, o pH foi o fator que mais influenciou no rendimento da extração, sendo que quanto mais ácido o meio, maior o rendimento. A temperatura também afetou significativamente o rendimento, mas, de modo contrário ao efeito negativo do pH, o efeito da temperatura foi positivo. Por outro lado, a interação entre pH e temperatura teve efeito negativo sobre o rendimento da extração (Figura 2a). Isto se dá porque ao se submeter a pectina a pH muito ácido e temperatura elevada ocorre a hidrólise do polissacarídeo. Os oligossacarídeos produzidos não são susceptíveis à ação do etanol como agente precipitante e, portanto permanecem solúveis, prejudicando o rendimento e a qualidade da pectina extraída. A interação das variáveis pH e tempo de extração não alterou significativamente o rendimento da extração (Figura 1). Como pode ser observado na Figura 2b, independentemente do tempo de extração utilizado, os maiores rendimentos foram obtidos em valores menores de valores de pH. Outros fatores que afetaram negativamente a extração foram a interação temperatura e o tempo de extração (Figura 2c). Assim sendo, os melhores valores

de extração ocorreram quando o processo foi feito em pH 1,0, temperatura de 80 °C, por 30 min.

Figura 1. Diagrama de pareto relacionando o efeito das variáveis pH, tempo e temperatura no rendimento de extração de pectina.

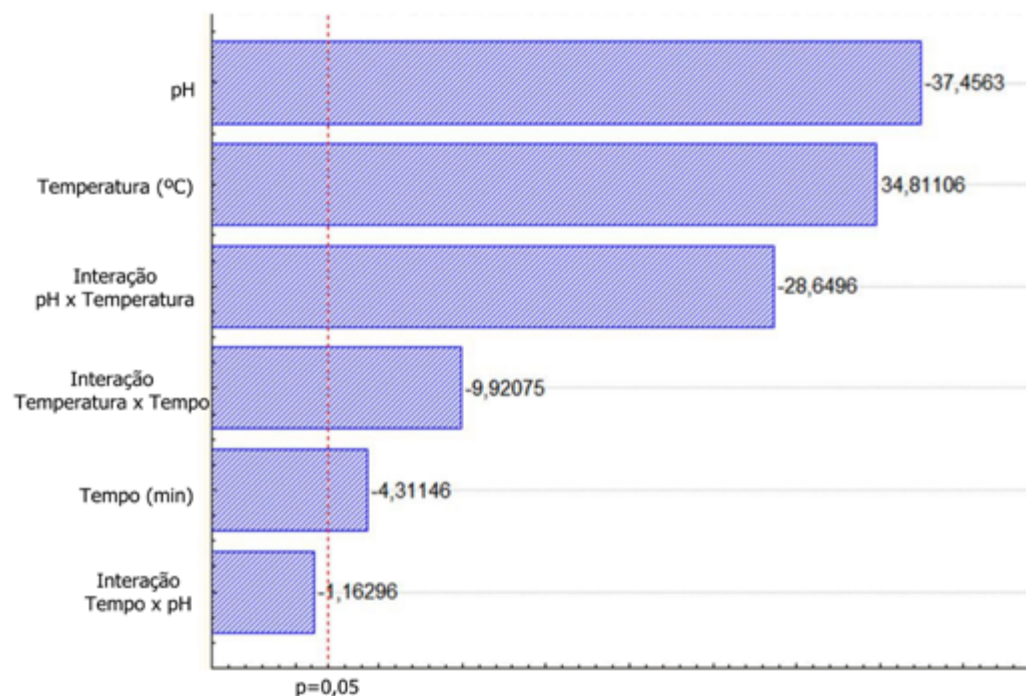
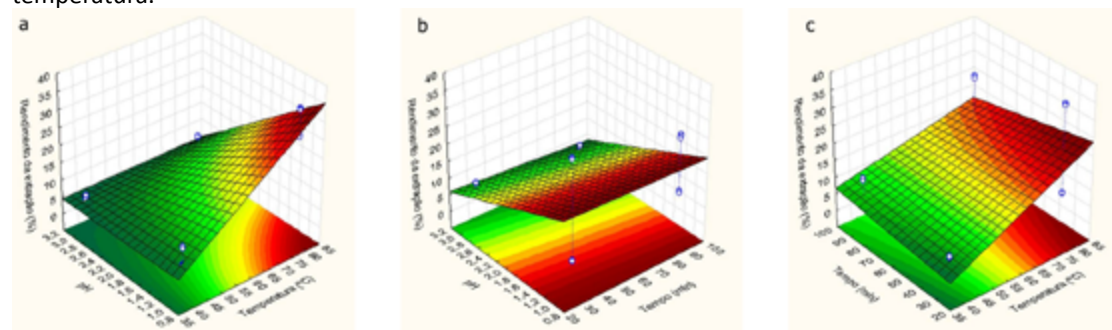


Figura 2. Superfície de resposta do rendimento de pectina em função do pH, tempo de extração e temperatura.



$$\% \text{ rendimento} = 0,98 \text{ temperatura} + 0,14 \text{ tempo} + 8,47 \text{ pH} - 0,003 \text{ temperatura} \cdot \text{tempo} - 0,25 \text{ temperatura} \cdot \text{pH} \quad (r=0,98)$$

Imobilização da Lipase:

Na Figura 3 estão apresentadas as atividades obtidas nos diferentes métodos de imobilização. O melhor resultado foi obtido quando a imobilização se deu por ligação covalente usando periodato de sódio como agente ativador, resultando em 0,186 UE imobilizada quando 100 μ L de solução de lipase foram

utilizados para imobilização. A imobilização por adsorção resultou em 0,102 UE imobilizadas quando 1,5 mL de solução foram utilizados, valor superior ao obtido na imobilização covalente via glutaraldeído, que foi de 0,037 UE.

A baixa disponibilidade de grupos amino derivados dos amino-açúcares presentes na pectina de lobeira foi comprovada por análise de infra-vermelho (Torralbo *et al.*, 2012) o que justifica o baixo rendimento da imobilização via glutaraldeído. Por outro lado a alta disponibilidade de grupos hidroxila vicinais presentes na estrutura da pectina foi responsável pela grande quantidade de grupos alvo do ataque do periodato e, portanto o melhor rendimento da imobilização por esta via (Tabela 2).

Figura 3. Atividade enzimática apresentada pela lipase imobilizada via (a) adsorção, (b) ligação covalente via periodato de sódio e (c) ligação covalente via glutaraldeído.

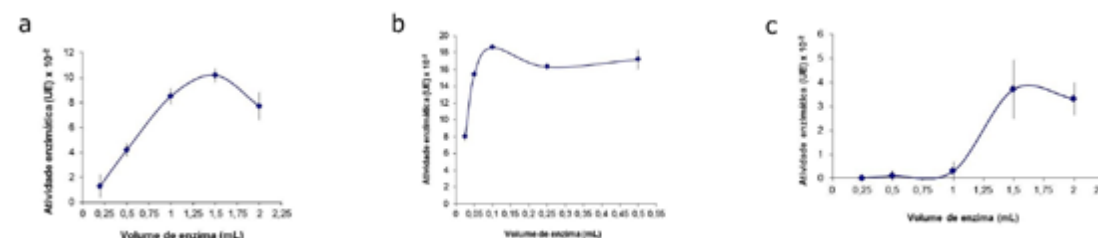


Tabela 2. Eficiência de imobilização de lipase em pectina de lobeira nos diferentes métodos utilizados.

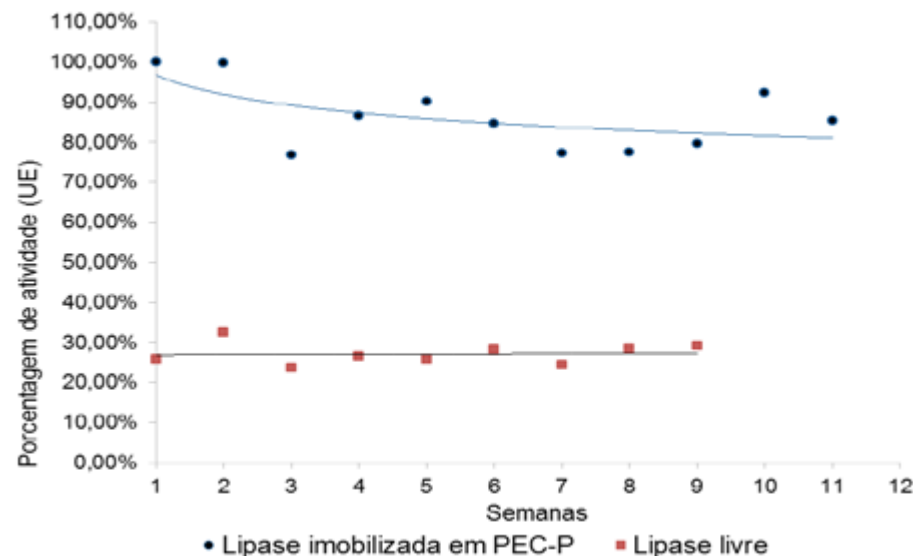
Método de imobilização	Volume de enzima utilizado (mL)	Atividade (UE)	Eficiência (%)
Adsorção	1,5	1,02	4,5
Lipase-PEC-G	1,5	0,037	0,2
Lipase-PEC-P	0,1	1,86	100

Estabilidade durante o armazenamento:

A estabilidade de catalisadores imobilizados é um dos principais parâmetros que determina a viabilidade econômica de processos biocatalisados (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Os sistemas PEC-lipase e PEC-G-lipase não apresentaram estabilidade para o uso repetido e armazenamento. Por outro lado, o sistema PEC-P-lipase pode ser utilizado repetidamente durante 11 semanas, com retenção de 85,4% da atividade inicial no sétimo uso (Figura 4). Esta retenção de atividade foi ainda mais expressiva quando se considera que a enzima imobilizada foi mantida em etanol. Os resultados de retenção da atividade ao longo do reuso encontrados neste trabalho foram similares aos apresentados por Al-Duri e Yong (2000), para Lipolase® imobilizada em compósito de polipropileno-sílica. Além disso, diversos outros autores, trabalhando com lipases oriundas de fontes diversas relataram

capacidade de reuso por até 10 ciclos, com atividade residual entre 40% e 80% (Amorim *et al.*, 2003; Romdhane *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2005).

Figura 4. Estabilidade da lipase livre e imobilizada durante o armazenamento em etanol, a 4°C. As atividades iniciais da lipase, livre e imobilizada, foram respectivamente, 2,03 UE e 2,01 UE.



Comparado à enzima livre, o resultado foi ainda mais expressivo, visto que a lipase livre apresentou uma redução de 74,3% na atividade em apenas uma semana de armazenamento nas mesmas condições. Além disso, estes resultados permitem prever que esta enzima imobilizada poderá atuar em reações de transesterificação utilizando-se etanol como reagente dada a sua alta estabilidade. As interações PEC-P-Lipase preservaram a estrutura tridimensional da enzima mesmo quando submetida a soluções desfavoráveis como a precipitação com etanol.

De acordo com Zaks e Klivanov (1995), para manter ativa uma enzima precisa de uma camada mínima de solvatação. A espessura da camada e o volume de água variam de enzima para enzima. No caso da lipase imobilizada em PEC-P, a alta hidrofiliabilidade do suporte garantiu que o microambiente onde a enzima está imobilizada permanecesse hidratado de modo a preservar as interações intramoleculares da proteína e, portanto, sua atividade (Fernandes *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

A imobilização por ligação covalente de lipase em pectina de lobeira ativada por periodato de sódio foi o método que resultou em maior rendimento de enzima imobilizada. A estabilidade da lipase imobilizada por esta via foi significativamente alta, especialmente por tratar-se de armazenamento em ambiente contendo solvente orgânico, neste caso o etanol. Além disto, a imobilização em pectina abre perspectiva de aplicação desta lipase na área de alimentos onde ambas, pectina e lipase possam atuar em formulações como emulsificante e catalisador.

AGRADECIMENTOS

Daniela Fernandes Torralbo e Rômulo Roosevelt da Silva Filho agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 207-215, 2000.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 1, jan. 1998. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiailImageURL&_cid=271450&_user=686368&_pii=S0032959297000460&_check=y&_origin=&_coverDate=31-Jan-1998&view=c&wchp=dGLzVlt-zSkWb&md5=66d5ae46f4c9e94d71e877beb0724803/1-s2.0-S0032959297000460-main.pdf>. Acesso em: 07 out. 2011.
- AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; LEDIGHAM, W. M. CAMPOS-TAKAKI, G. M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresource Technology*, v. 89, p.35-39, 2003.
- CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilisation. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, n. 7, p. 1159-1163, ago. 2008.
- CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; RIBEIRO, L. J. Constituintes químicos da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante a maturação. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 1, jan./mar. 2000. Disponível em: < http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/24-1-2000_17.pdf>. Acesso em: 07 out. 2011.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilized onto polyaniline. *Process Biochemistry*, v.39, p. 957-962, 2004.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 11, p. 3441-3445, nov. 2005.

OLIVEIRA JÚNIOR, E. N.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, J. Z. L. Análise nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, jul./ago. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v27n4/v27n4a16.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2011.

PAGÁN, J. Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón. 1999. Lleida. 142 p. Tese (Doutorado em Biotecnología). **Escola de tecnologia de alimentos e de engenharia agrária**, Universidade de Lleida, 1999.

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Emzymatic**, v.68, p. 230-239, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, T. M.; SANTIAGO, P. O.; PURCENA, L. L. A.; FERNANDES, K. F. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization – Structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 526-530, 2010.

TORRALBO, D. F.; BATISTA, K. A.; Di-MEDEIROS, M. C. B.; FERNANDES, K. F. Extraction and partial characterization of *Solanum lycocarpum* pectin. **Food Hydrocolloids**, v.27, p. 378-383, 2012.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M.. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p. 663-670, 1979.

YE, P. XU, Z. K.; CHE, A. F.; WU, J.; SETA, P. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. **Biomaterials**, v. 26, p. 6394-6403, 2005.

ZARKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme catalyzed processes in organic solvents. **Proceeding of the National of Sciences of the United States of American**, v. 82, p. 3192-3196, 1995.