



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

SIMONE MARIA GOLUNSKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASES E LIPASES EM
DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**

**ERECHIM
2015**

SIMONE MARIA GOLUNSKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASES E LIPASES EM
DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação da Prof.^a Dra. Helen Treichel e da Prof.^a Dra. Gean D. L. P. Vargas.

ERECHIM
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rua General Osório, 413D
CEP: 89802-210
Caixa Postal 181
Bairro Jardim Itália
Chapecó - SC
Brasil

SIMONE MARIA GOLUNSKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE E PEROXIDASES COMERCIAIS E
NÃO COMERCIAIS EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em ____/____/20____.

Orientador (as): Prof^ª. Dra. Helen Treichel
Prof^ª. Dr^ª. Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel – UFFS

Prof^ª. Dr^ª. Gean Delise Leal Pasquali Vargas – UFFS

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago – URI

Prof^ª. Dr^ª. Clarissa Dalla Rosa – UFFS

Erechim/RS, 15 de outubro de 2015.

*Dedico aos meus pais, Laurindo e Lúdia,
que por uma vida de dedicação, amor
e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de estudar.*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Deus sempre presente em meus dias.

Aos meus pais, Laurindo e Lídia, que sempre me incentivaram, ajudaram e torceram por minhas conquistas.

As minhas orientadoras Helen Treichel e Gean Vargas pela confiança, amizade, dedicação e diversos ensinamentos na orientação deste trabalho.

À minha irmã Cátia, sempre presente, pela amizade e disponibilidade em me ajudar.

As bolsistas: Marina Sbardelotto, Aline Frumi Camargo, Camila Dalla Rosa, Bruno Venturin, Jéssica Mulinari, Analise Dall Agnol e Daiane P. Baldissareli pela contribuição para a realização deste trabalho;

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se
e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos
benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

RESUMO

O presente trabalho investigou diferentes estratégias com o objetivo de incrementar a atividade das enzimas peroxidases e lipase (comercial e não comercial). Para tal, as enzimas foram submetidas a tratamentos em banho ultrassônico e micro-ondas a fim de avaliar o efeito destes sistemas, bem como a potência e a temperatura através de planejamentos experimentais. As enzimas peroxidases extraídas de farelo de arroz e farelo de soja quando tratadas em ultrassom, apresentaram um incremento de atividade (129,52% FA e 147,89% FS), sendo que para a enzima comercial, o incremento de atividade não foi tão expressivo. Também foi observado modificações no comportamento da enzima lipase (não comercial) quanto a sua atividade hidrolítica, visto que, se obteve um incremento de aproximadamente 300 % na atividade enzimática relativa, se comparado a atividade da enzima sem o tratamento com o ultrassom. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que o tratamento com micro-ondas constitui um meio de reação para a realização de reações catalisadas por peroxidases, pois foi possível obter ganho de atividade nos ensaios realizados. A literatura atual apresenta uma escassez de trabalhos que avaliam as mudanças em termos de atividade e estabilidade enzimática após exposição ao ultrassom e as micro-ondas. Poucos trabalhos científicos foram encontrados demonstrando assim que o trabalho realizado é de extrema relevância para a área das Ciências Ambientais, visto que as enzimas em estudo poderão ser aplicadas para diferentes fins, como por exemplo, degradação de micotoxinas e tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Peroxidase. Ultrassom. Micro-ondas.

ABSTRACT

This study investigated different strategies in order to increase the activity of oxidative enzymes and lipase (commercial and noncommercial). To this end, the enzymes were subjected to treatment in an ultrasonic bath and a microwave in order to evaluate the effect of these systems as well as power and temperature using experimental design. Peroxidases enzymes extracted from rice bran and soybean meal when treated in ultrasound showed an activity increase (129.2% 147.89% FA and FS), and for the commercial enzyme, the increase in activity was not unimpressive. It was also observed changes in the behavior of lipase enzyme as its hydrolytic activity, since there was obtained an increase of approximately 300% enzyme activity relative to enzyme activity compared to without treatment with ultrasound. The data obtained in this study suggest that the treatment with microwaves is a reaction medium for conducting reactions catalyzed by peroxidases because it was possible to obtain gain in activity tests. The current literature shows a lack of studies that evaluate the changes in terms of activity and enzyme stability after exposure to ultrasound and microwave. Only a few scientific papers were find showing that the proposed work is extremely relevant to the area of environmental sciences, since the enzymes under consideration can be apply at different reactions, such as degradation of mycotoxins and effluent treatment.

Keywords: Peroxidase. Ultrasound. Microwave.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das peroxidases de FA (a) e FS (b). 25
- Figura 2.** Superfícies de resposta para avaliação do comportamento da atividade relativa da enzima peroxidase obtida de FA (a) e FS (b). 29
- Figura 3.** Superfícies de respostas para exposição do extrato bruto ao banho termostático ultrassônico. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resíduos utilizados para produção de lipase em FES.....	11
Tabela 2. Caracterização química do FA e FS.	23
Tabela 3. Purificação de peroxidases obtidas de FA e FS.....	24
Tabela 4. Matriz do DCCR 2 ² (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade relativa das peroxidases. Atividade inicial peroxidase FA = 440 U/mL, peroxidase FS = 740 U/mL, peroxidase raiz forte = 539,66 U/mL.	27
Tabela 5. Modelos propostos para a atividade relativa da enzima peroxidase extraída do FA e do FS em função da potência do ultrassom (%) e a temperatura (°C).	28
Tabela 6. Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade relativa das peroxidases.	28
Tabela 7. Atividades residuais das enzimas peroxidases comerciais e não comerciais quando tratadas em micro-ondas.	30
Tabela 8. Matriz do DCCR realizado (valores codificados e reais) e valores de atividade relativa obtidos para a enzima lipase após tratamento em ultrassom.	31
Tabela 9. Análise de variância aplicada ao modelo apresentado na Equação 2.	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
1.1.1 Objetivo geral.....	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 ENZIMAS.....	5
2.2 A ENZIMA PEROXIDASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA.....	6
2.2.1 Extração da enzima peroxidase	7
2.2.2 Farelo de arroz (FA)	8
2.2.3 Farelo de Soja (FS).....	8
2.3 A ENZIMA LIPASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA.....	9
2.3.1 Produção de Lipases.....	10
2.4 TRATAMENTO DE ENZIMAS E TÉCNICAS DE TRATAMENTO.....	12
2.4.1 Ultrassom	12
2.4.2 Micro-ondas	14
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	17
3.2 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE.....	17
3.2.1 Caracterização química dos farelos.....	17
3.2.2 Estudo de extração da enzima.....	17
3.2.3 Medida de atividade da enzima.....	18
3.2.4 Pré-purificação e purificação de enzima.....	18
3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS PEROXIDASES EM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS.....	19
3.3.1 Avaliação do comportamento das enzimas peroxidases quando submetidas a ultrassom.....	19
3.3.2 Avaliação do comportamento das enzimas peroxidases em micro-ondas.....	20
3.4 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LIPASE.....	20
3.4.1 Preparo do Meio para Fermentação (FES).....	20
3.4.2 Obtenção do Extrato Enzimático Bruto.....	20
3.4.3 Determinação da Atividade Hidrolítica	21
3.5 AVALIAÇÕES DO COMPORTAMENTO DA ENZIMA LIPASE EM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS.....	21
3.5.1 Avaliação do comportamento da enzima lipase quando submetida a ultrassom.....	21
3.5.2 Avaliação do comportamento da enzima lipase em micro-ondas.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

4.1 EXTRAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE.....	23
4.1.1 Caracterização química dos subprodutos para extração da enzima peroxidase	23
4.1.2 Condições de extração da peroxidase	23
4.1.3 Purificação da enzima	24
4.2 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS PEROXIDASES EM SISTEMAS REACIONAIS.....	26
4.2.1 Tratamentos em ultrassom das enzimas peroxidase comercial e não comercial.....	26
4.2.2 Tratamentos em micro-ondas das enzimas peroxidases comercial e não comercial	30
4.3 AVALIAÇÃO DA ENZIMA LIPASE EM SISTEMAS REACIONAIS.....	31
5. CONCLUSÕES.....	36
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores e podem ser empregadas em vários processos industriais. Enzimas de origem microbiana ou origem vegetal podem ser extraídas de subprodutos da agroindústria e serem utilizadas com um bom desempenho após passarem por tratamentos em sistemas operacionais, com a finalidade de resolver problemas específicos (BON et al., 2008).

Observando o crescimento da produção agrícola no Brasil em seus mais diversificados produtos, é notável o destaque que se dá na região Sul à produção de arroz e soja (MAPA, 2011). Durante o processo de moagem e extração de óleos dos grãos, milhares de toneladas de farelo de soja e farelo de arroz são produzidas. Esse subproduto extraído é dito durante o processo industrial como resíduo, apresentando alto valor nutritivo, largamente empregado na produção de rações animais (KHAN et al., 2011). De acordo com vários estudos desenvolvidos com esses coprodutos, eles são portadores de uma alta concentração de proteínas, destacando-se as enzimas que possuem alto valor comercial agregado, como as peroxidases (CAO et al., 2009; INDIANI et al., 2000).

Peroxidases são oxidoredutases produzidas por um número diverso de microorganismos e plantas, responsáveis por catalisar uma variedade de reações de oxidação na presença de peróxidos, tais como peróxido de hidrogênio. Nas plantas terrestres e algas marinhas, as peroxidases estão envolvidas na resistência a patógenos, na cicatrização e na limpeza e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio.

Essas enzimas oxidativas são amplamente empregadas em bioquímica clínica e imunoensaios, seu uso na maior parte dos processos degradativos explica-se pelo mesmo envolver reações de oxidação, despertando assim o interesse de pesquisadores pela sua aplicação (BON et al, 2008). Algumas aplicações têm sido sugeridas incluindo tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos, síntese de vários produtos químicos aromáticos e remoção de peróxido de materiais, tais como alimentos e resíduos industriais (HAMID e REHMAN, 2009). Há também a hipótese de que peroxidases podem intervir diretamente no mecanismo de defesa antifúngica, conferindo atividade antifúngica contra *Aspergillus sydowii* (MYDLARZ e HARVELL, 2007).

A tecnologia enzimática é um campo bastante promissor dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, o que torna possível a

aplicação de diversas enzimas na qualidade final de um produto e na redução de custos do processo (MALDONADO, 2006). Além da enzima peroxidase, a lipase também possui uma ampla gama de aplicações.

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem ao grupo das enzimas hidrolases, constituem um dos grupos mais importante de biocatalisadores. São enzimas de considerável importância fisiológica, indispensáveis para a bioconversão de lipídios na natureza (SMANIOTTO, 2010). Apresentam capacidade de catalisar a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol para diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e até ácidos graxos livres (CARVALHO et al., 2003). Sendo elas ainda potencialmente aplicadas em diversos processos devido a sua afinidade com uma ampla gama de substratos, e suas estabilidades à temperatura, pH e solventes orgânicos.

A aplicação de tortas residuais do processo de extração de óleos vegetais como: de soja, canola, coco, gergelim e oliva, como fonte de nutrientes para vários processos biotecnológicos pode contribuir para se obter lipases com altos rendimentos (RAMACHANDRAN et al., 2007).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de lipases mais robustas e altamente específicas, ampliando as possibilidades de aplicações industriais (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Desta forma, torna-se interessante a exploração da biodiversidade buscando micro-organismos hábeis a produzir lipases, considerando que estas são enzimas que podem ser secretadas por uma grande quantidade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (SAXENA et al., 2003), indicando assim, perspectiva promissora na área científica e comercial.

Considerando a evolução de processos ambientais e a busca por uma gestão de resíduos industriais, (em caráter de reutilização, como na produção e extração de enzimas a partir de resíduos), redução de fontes e reciclagem, conceituam tecnologias limpas, desenvolvidas sem o uso de produtos que agredam o meio ambiente, substituindo catalisadores químicos por biológicos como enzimas.

Na busca por maior eficiência nos processos biocatalíticos enzimáticos esse trabalho propõe o estudo da avaliação do efeito do ultrassom e das micro-ondas na atividade das enzimas lipase produzida via microbiana e peroxidases comerciais e não comerciais extraídas de coprodutos agroindustriais.

Na última década, o ultrassom surgiu como uma alternativa no processamento para os tratamentos convencionais em alimentos e processos biotecnológicos.

(O'DONNELL et al., 2010; KWIATKOWSKA et al., 2011). Os efeitos físicos e químicos do ultrassom são originados pelo colapso cavitacional, que produz condições extremas e, portanto induz a formação de espécies químicas que não são facilmente obtidos em condições convencionais. Como consequência, o fenômeno de cavitação pode aumentar as taxas de reação e, portanto, pode tornar-se uma ferramenta útil em reações enzimáticas (BATISTELA et al., 2011). Embora a aplicação do ultrassom em reações enzimáticas está sendo cada vez mais explorada (LERIN et al., 2011; CENI et al., 2014; Li et al., 2005; APAR et al., 2006; FIAMETTI et al., 2011) são poucos os trabalhos que avaliam a influência do ultrassom sobre as características da enzima de forma isolada (BATISTELA et al., 2011; WANG et al., 2011; OZBEK et al., 2000; SHAH et al., 2008).

A irradiação por micro-ondas oferece um método limpo, barato e conveniente de aquecimento, o que é uma maneira alternativa de fornecer energia para sistemas químicos. Os efeitos das micro-ondas em reações químicas estão relacionados ao atrito molecular de curto alcance devido à polarização contínua de moléculas causada pela sua irradiação. Esse processo de dipolos ordenados (com campo eletromagnético) e desordenados (sem o campo) aumenta o atrito entre as moléculas, aumentando a temperatura local e as taxas de reação. O aquecimento de líquidos usando micro-ondas pode ser explicado pela interação da matéria com o campo eletromagnético da radiação incidente, causando movimento de íons assim como de dipolos induzidos ou permanentes (LOPES et al., 2015). A irradiação por micro-ondas resulta numa mudança das propriedades termodinâmicas dos sistemas reativos, sendo considerada uma importante ferramenta para aplicação em processos enzimáticos, o que pode acabar levando a uma ativação de enzimas.

No estudo desenvolvido neste trabalho, diferentes parâmetros foram avaliados em ambos os sistemas, tais como, tempo de exposição, temperatura e potência. Acredita-se que os resultados obtidos serão de extrema relevância na área específica, pois mudanças conformacionais e/ou estruturais poderão alterar a especificidade das enzimas avaliadas, bem como suas atividades, podendo assim contribuir na atividade catalítica quando se visa posterior uso em tratamento de efluentes e na degradação de micotoxinas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral a avaliação do efeito do ultrassom e das micro-ondas na atividade das enzimas peroxidases comerciais, extraídas de coprodutos agroindustriais (farelo de soja e arroz) e lipases produzida via microbiana.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair a enzima peroxidase de farelo de soja e farelo de arroz e purificá-la.
- Avaliar o comportamento da atividade de peroxidases comerciais e não comerciais quando exposta a ultrassom e micro-ondas.
- Produzir a enzima lipase de *Aspergillus niger* utilizando torta de canola como substrato.
- Avaliar o comportamento da atividade da enzima lipase de *Aspergillus niger* quando exposta a ultrassom e micro-ondas.
- Investigar parâmetros como tempo de exposição, temperatura e potência em ambos os sistemas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo destina-se a apresentação da revisão bibliográfica referente as enzimas de interesse neste trabalho, peroxidases e lipases.

Serão abordados os seguintes tópicos: definições, aplicações, métodos de extração, bem como estudos sobre a avaliação da atividade destas enzimas após tratamentos em diferentes sistemas reacionais.

2.1 ENZIMAS

Enzimas são uma classe de moléculas que catalisam uma grande variedade de reações com alta eficiência catalítica e especificidade sob condições moderadas (pH, temperatura, solventes, força iônica), com isso resultam em menores problemas ambientais e toxicológicos quando comparadas com catalisadores químicos (SANTOS, 2007). Podem ser extraídas de tecidos animais (pancreatina, tripsina, pepsina e renina) e fontes vegetais (papaína, bromelina, ficina, malte, peroxidase) (BON *et al*, 2008).

Cerca de 4.200 enzimas estão listadas no *Enzyme Nomenclature Database*. Destas apenas cerca de 50-100 são usadas em escala industrial. A princípio, cada organismo é uma fonte potencial de enzimas, mas para aplicações industriais, tanto a estabilidade quanto os rendimentos devem ser adequados (LINKE e BERGER, 2011).

Enzimas são menos propensas a serem inibidas por substâncias que podem ser tóxicas aos organismos vivos e seu custo pode ser menor quando comparada a outros métodos (HAMID e REHMAN, 2009). As condições moderadas de reação permitem reduzir as reações secundárias, diminuindo assim a formação de produtos indesejáveis e a decomposição de substratos e produtos (BON *et al*, 2008).

O uso prático de enzimas tem sido realizado em vários processos industriais, e está sendo expandido em novos campos, como na síntese química, em produtos farmacêuticos, alimentos, biossensores e células de biocombustível (KIM *et al.*, 2006; FENG e JI, 2011). Muitas enzimas de origem microbiana ou vegetal estão sendo utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais, resolvendo problemas específicos. Grande parte da degradação de poluentes orgânicos envolve reações de oxidação, onde a utilização de enzimas nessas reações está despertando o interesse de pesquisadores. Entre as enzimas mais estudadas nas últimas décadas para este fim, estão as enzimas oxidativas, em especial peroxidases e fenol-oxidases, pois catalisam reações

de oxidação de compostos aromáticos, uma das principais classes de substâncias poluentes e tóxicas (BON *et al.*, 2008).

Já as lipases por serem enzimas com característica de hidrolisar óleos e gorduras, são de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gorduras, estas tem sido estudadas com o objetivo de reduzir a carga de lipídios presentes em efluente industriais, pois estes compostos além de representar uma perda industrial significativa, interferem negativamente nos sistemas de tratamento de efluentes (MENDES *et al.*, 2005).

2.2 A ENZIMA PEROXIDASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA

Peroxidases são ubíquas na natureza, não dependem de cofatores e atuam sobre um amplo número de substratos. De acordo com a *Enzyme Commission* (EC) cada enzima recebe um número de classificação com quatro dígitos e um nome sistemático que identifica a reação catalisada e, em muitas delas, ocorre a adição do sufixo “ase” ao nome dos substratos. O primeiro dígito (1) indica o nome da classe (oxidoreductase), o segundo dígito (11) indica a subclasse (peroxidase – pois atua como receptor de elétrons sobre a molécula de peróxido), o terceiro (1) indica a sub-subclasse e o quarto dígito a sub-sub-subclasse (NELSON, 2011).

Peroxidases (CE 1.11.1.X) catalisam a oxidação de elétrons de uma variedade de xenobióticos oxidáveis usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como molécula aceptora (TEKCHANDANI e GURUPRASAD, 1998; TAFAZOLI e O'BRIEN, 2005; MATHÉ *et al.*, 2010). Sua atividade foi identificada em plantas, micro-organismos e animais. Devido à sua natureza oxidativa, há diversas áreas onde a peroxidase poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (HAMID e REHMAN, 2009). A maior parte de degradação de poluentes orgânicos envolve reações de oxidação, sendo natural que o emprego de enzimas nessas reações desperte o interesse de pesquisadores. Assim, pode-se citar a remoção por precipitação ou transformação, de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como a biodegradabilidade ou diminuição da toxicidade (KARIM e HUSAIN, 2009).

Algumas novas aplicações de peroxidases incluem o tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos, a síntese de produtos químicos aromáticos e remoção de peróxidos de materiais. Estes compostos são encontrados nas águas residuais de uma ampla variedade de indústrias, refino de petróleo, resinas e plásticos, madeira, corantes

e produtos químicos, têxteis, de mineração, pesticidas, herbicidas e outros agroquímicos (MAY, 1999; HAMID e REHMAN, 2009). A redução de peróxidos à custa de um substrato doador de elétrons faz com que as peroxidases se tornem úteis em processos industriais e aplicações analíticas (HAMID e REHMAN, 2009). Também, são especialmente e temporalmente associadas à diminuição na taxa de multiplicação e *disseminação* de patógenos, sugerindo a peroxidase um papel ativo de resistência (CHITTOOR et al., 1997).

A peroxidase pertence a uma classe de enzimas largamente distribuída em 3 superfamílias (vegetal, animal e micro-organismos). Essas enzimas, com origem microbiana ou vegetal, são utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais, resolvendo problemas específicos. Esta é facilmente extraída das células de alguns vegetais, nas plantas, a peroxidase tem um papel importante, pois participa do processo de lignificação e do mecanismo de defesa física contra tecidos danificados ou infectados (NICELL e WRIGHT, 1997; HAMID e REHMAN, 2009). Segundo Veitch (2004) cada espécie vegetal contém um conjunto de isoenzimas de peroxidase com potencial para realizar uma variedade de funções diferentes, com várias formas moleculares e uma ampla distribuição subcelular (MOTAMED et al., 2009).

2.2.1 Extração da enzima peroxidase

Peroxidases são oxidorreduzases produzidas por um número diverso de micro-organismos e plantas. O estudo de diferentes fontes de peroxidase possibilita a redução nos custos de produção dessa enzima, e viabiliza a aplicação em processos industriais. Nesse sentido, há a avaliação da reutilização de subprodutos da agroindústria, visto que esses em sua grande maioria são empregados para desenvolvimento de rações animais por sua alta concentração de proteínas.

Dentre as diferentes fontes vegetais utilizadas para a extração das peroxidases destacam-se a soja (*Glycine max (L.) Merr.*) e o arroz (*Oryza sativa L.*). Estas culturas são consideradas as principais culturas do Rio Grande do Sul. Segundo dados do CONAB (2015) é estimada uma produção de 8.169.900 (oito milhões, cento e sessenta e nove mil e novecentas toneladas) de arroz na safra 2014/2015, correspondendo a 28,75 % da produção de grãos do estado, 66,98 % da produção nacional de arroz e 4,04 % da produção nacional de grãos. Já para a soja, a produção estimada para o mesmo período é de 13.464,00 (treze milhões e quatrocentos e sessenta e quatro mil toneladas). A produção de soja do Rio Grande do Sul representa 47,58% da produção de grãos do

estado, 14,03% da produção nacional de soja e 6,66% da produção nacional de grãos. Após o processamento destes grãos, temos o farelo, o qual é um subproduto, um resíduo dos processos agroindustriais que apresenta alto valor nutritivo, não na sua totalidade, mas principalmente quando empregado na produção de rações animais (KHAN et al, 2011). Estudos desenvolvidos com estes subprodutos (farelo de arroz e farelo de soja) relataram a alta concentração protéica, destacando-se diversas classes enzimáticas que podem estar vinculadas a um emprego comercial (INDIANI et al., 2000; CAO et al., 2009).

Levando em consideração a evolução de processos ambientais na gestão de resíduos industriais, em caráter de reutilização, redução da fonte e reciclagem, conceituando assim tecnologias limpas sem o uso de produtos que agridam o meio ambiente, esse trabalho propõe o uso da extração da enzima peroxidase a partir de subprodutos agroindustriais, como farelo de arroz e farelo de soja.

2.2.2 Farelo de arroz (FA)

O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios (WALTER et al., 2008). Um dos subprodutos resultantes do seu beneficiamento é o farelo, o qual representa de 8 % a 11 % do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento. O FA apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato, é a cutícula entre a casca do arroz e os grãos de arroz sendo obtido como um subproduto do processamento de arroz (AMARASINGHE et al., 2009).

Mesmo o FA sendo utilizado para a produção de alguns alimentos e ração animal, boa parte vem sendo descartada, porém a extração de seus componentes viabiliza a reutilização desse subproduto com alto valor agregado (PESTANA et al., 2008). Um exemplo disso é a extração da peroxidase, pois o FA é uma fonte de peroxidase, além desta enzima se destaca também a presença de outras como lipases, lipoxigenases, catalases entre outras (LUH et al., 1991).

2.2.3 Farelo de Soja (FS)

Nos últimos trinta anos o Brasil tornou-se o segundo maior produtor mundial de soja e o segundo maior exportador de soja e farelo de soja com uma participação de mais de 33% do mercado mundial (CONAB, 2012).

O crescimento na produção de soja no Brasil vem sendo estimulado pelo

aumento da demanda do grão como uma fonte boa e barata de proteína e calorias para produção de ração animal na Comunidade Europeia. O biodiesel de soja, juntamente com o etanol de cana-de-açúcar, vem ocupando um papel central na discussão dos projetos de produção de biocombustíveis que vêm sendo implantados no Brasil (CAVALETT, 2008).

O farelo é um dos derivados da soja, após a extração do óleo, que é utilizado para a alimentação animal, sendo mais ricos em proteínas do que aqueles derivados de outras oleaginosas como a canola e o girassol. A enzima peroxidase também pode ser extraída do farelo de soja, sendo relatada na literatura quanto a sua aplicação em processos de descontaminação ambiental, frente a corantes (SILVA et al., 2013) e outros compostos orgânicos (PARKER et al., 2012).

2.3 A ENZIMA LIPASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA

São enzimas facilmente obtidas a partir de micro-organismos e de células de origem animal e vegetal, sendo um biocatalisador bastante versátil, que pode ser utilizado em biocatalise em meio orgânico e em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (SHANG et al., 2015). As lipases tem apresentado algumas vantagens como a alta atividade, estabilidade, regioespecificidade e estereoseletividade, podendo ser usada em diversas aplicações dentro da indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e química fina (SHANG et al., 2015).

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3) são muito utilizadas, em virtude da grande gama de reações que podem catalisar, como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA et al., 2001), além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Por este motivo, são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais.

Podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo as últimas as mais utilizadas. Dentre as enzimas microbianas, as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (CARVALHO et al., 2003). Os fungos filamentosos têm sido estudados como bons produtores de lipases, sendo os gêneros mais citados *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Colletotrichum* dentre outros (SHARMA et al., 2001; MAIA et al., 2001; MAHADIK et al., 2002; COLEN, 2006).

Essas enzimas são capazes de atuar na ligação éster-caboxílica de triglicerídeos, sintetizando assim ácidos graxos e glicerol. Devido a sua especificidade, estas enzimas são amplamente aplicadas em diversos processos que não são somente os convencionais como na produção de biodiesel e tratamento de efluentes com elevada carga lipolítica (PASTORE et al., 2003; MENDES et al., 2005).

Entretanto, sua obtenção comercial é de alto custo, e desse modo, uma alternativa além da otimização da produção da enzima via fermentação em estado sólido, é a busca de soluções que promovam um incremento na atividade hidrolítica e a estabilidade destas enzimas, dentre elas estão exposição a radiações, o armazenamento em diferentes temperaturas, mudança de pH e o uso do ultrassom.

2.3.1 Produção de Lipases

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de lipases mais robustas e altamente específicas, ampliando as possibilidades de aplicações industriais (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Desta forma, torna-se interessante a exploração da biodiversidade buscando micro-organismos hábeis a produzir lipases, considerando que estas são enzimas que podem ser secretadas por uma grande quantidade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (SAXENA et al., 2003), indicando assim, perspectiva promissora na área científica e comercial.

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (CASTILHO et al., 2000; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; PANDEY, 2003; SANTIS-NAVARRO et al., 2011; MURUCI, 2012; SBARDELOTTO et al., 2013).

Para que a produção de enzimas seja maximizada é de fundamental importância levar em consideração o meio fermentativo, este devendo proporcionar nutrientes necessários ao crescimento da cepa e produção de metabólitos, além de suprir a energia utilizada para biossíntese de manutenção da célula (SMITS *et al.*, 1996). Sbardelotto et al., (2013) verificou a necessidade de inserção de uma fonte complementar de nitrogênio em farelo de canola, afim de maximizar a produção de lipase utilizando o fungo *Aspergillus sp.*

O meio deve ser composto basicamente por fonte de carbono, fonte de nitrogênio (seja ela orgânica ou inorgânica), sais orgânicos, vitaminas e indutores, quando necessários para a produção de lipase, visto que existem lipases induzíveis e constitutivas (ALONSO, 2001). Segundo Dalmau et al. (2000) a presença de substratos lipídicos (e seus metabólitos, como ácidos graxos) pode estimular a produção de lipases.

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado (SBARDELOTTO et al., 2013), pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo, quando comparada à fermentação submersa (CASTILHO et al., 2000).

As tortas residuais de processos de extração de óleos são bastante usadas na indústria de alimentos para animais, por possuírem boas quantidades de proteína. Muitos estudos têm avaliado o uso das tortas de oleaginosas em bioprocessos. Aplicação biotecnológica de torta de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras, podem ser utilizadas para obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas, entre outras.

Na produção de enzimas as tortas são usadas como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (RAMACHANDRAN et al., 2007). A Tabela 1 apresenta alguns resíduos (substratos) utilizados para produção de lipases utilizando fermentação em estado sólido.

Tabela 1. Resíduos utilizados para produção de lipase em FES.

Resíduo	Autor	Micro-organismo
Farelo de Babaçu	AZEREDO et al., 2007	<i>P. restrictum</i>
Farelo de trigo	MAHADIK et al., 2002	<i>A.niger</i>
Farelo de soja	AGRAWAL et al., 2004	<i>Penicillium sp.</i>
Farelo de babaçu	CAVALCANTTI et al., 2005	<i>P. simplicissimum</i>
Bagaço de cana	DIAZ et al., 2006	<i>R. homothallicus</i>
Farelo de casca de trigo	MEIRA et al., 2005	<i>Burkholderia cepacia</i>
Farelo de semente de girassol	MONTEIRO et al., 2007	<i>P. aerugionosa</i> DAUPE 614
Farelo de trigo	DUTRA et al., 2008	<i>A. niger</i>
Farelo de canola	SBARDELOTTO et al., 2013	<i>Aspergillus sp.</i>

Neste trabalho, optou-se por utilizar a torta de canola para a produção da enzima lipase, visto que a mesma já foi investigada pelo grupo de pesquisa sendo otimizada sua produção no trabalho de Sbardelotto et al., (2013), além de serem encontrados poucos

estudos na literatura referente a este subproduto, e também por este ser facilmente encontrado em nossa região.

2.4 TRATAMENTO DE ENZIMAS E TÉCNICAS DE TRATAMENTO

A utilização de enzimas em bioprocessos enzimáticos pode acarretar em redução no consumo de energia e água destinada ao processo, produção de efluentes com baixa toxicidade, no entanto estes processos costumam apresentar taxas de reação baixas (RAMÓN et al., 2015), assim o uso de tecnologias que possam melhorar o desempenho enzimático são de extremo interesse. Novas técnicas de tratamento de enzimas com o objetivo de melhorar o desempenho enzimático estão sendo estudadas, como o uso de ultrassom e micro-ondas.

2.4.1 Ultrassom

O ultrassom vem se destacando nas últimas décadas como uma alternativa aos processos convencionais dentro da área biotecnológica (SOUZA et al., 2013), com diferentes finalidades, em sua maioria, sendo usado para o rompimento celular (NUNES et al., 2014), afim de melhorar o processo de extração enzimático ou no tratamento conjunto da enzima e substratos em reações enzimáticas como no trabalho de Liu et al. (2015).

Este é definido como um som agudo acima da audição humana, que é usado para uma variedade crescente de finalidades em diversas áreas. É considerado uma “tecnologia verde”, devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, seu desempenho ser economicamente viável e devido à redução significativa no tempo de processo em comparação com outras técnicas convencionais (ROKHINA et al., 2009).

O uso de um banho ultrassônico tem vantagens, como simplicidade e baixo custo. As limitações mais evidentes são de que a frequência de operação é normalmente fixa e podem ocorrer variações de potência dentro do banho, conseqüentemente, a padronização dos locais de amostragem é essencial para fins comparativos (BARTON et al., 1996).

O funcionamento de um banho ultrassônico consiste na produção de ondas sonoras de alta frequência por um gerador de ultrassom, as quais são convertidas por um cristal piezolétrico (transdutor) em ondas mecânicas no interior do líquido, normalmente água. A propagação dessas ondas no meio reacional origina uma variação de pressão,

por se movimentarem mais rapidamente que o líquido. Dessa forma, ocorre a formação de bolhas microscópicas de ar e vapor de água, chamada de cavitação (BARBOZA e SERRA, 1992; SANTIN, 2013).

A formação de cavitação se dá em três fases: formação de bolhas, crescimento e violenta implosão. A implosão das bolhas produz um grande aumento da temperatura, que é dissipada no líquido. No bioprocessamento enzimático, é importante a formação de cavitação, o crescimento e colapso implosivo de bolhas no líquido. O rápido colapso das bolhas de cavitação forma forças de cisalhamento no líquido e como resultado produz uma forte agitação. Esse efeito pode aumentar significativamente a transferência de calor e massa, podendo ser útil para o carregamento dos reagentes ao sítio ativo da enzima e assim aumentar sua atividade (CONDON et al., 2009, WANG et al., 2011).

O ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência em: alta frequência e baixa potência (2-10 MHz) de ultrassom, também chamado de longo alcance ou ultrassom diagnóstico, que é usado na área médica e em análises químicas, e baixa frequência e alta potência (20-100 kHz) de ultrassom, o tipo convencional de ultrassom que é usado para limpeza. Nesse caso, as bolhas formadas possuem uma dimensão menor, o que facilita a difusão no líquido (ROKHINA et al., 2009).

Durante anos, o ultrassom tem sido utilizado em várias aplicações da biotecnologia, por exemplo, com a finalidade de rompimento celular para liberar enzimas intracelulares e organelas que são aplicadas na indústria e medicina. Outras aplicações incluem a transferência facilitada da célula para o solvente, a intensificação de transferência de massa de celulose e pectinase durante o bioprocessamento de tecidos de algodão e durante a oxidação do colesterol para colestenoína por células de *Rhodococcus erythropolis*. O ultrassom mostrou influenciar a cinética da reação e reduzir o tempo de reações de esterificação (ROKHINA et al., 2009).

A aplicação do ultrassom em reações enzimáticas pode ser dividida em dois grupos: o primeiro que utiliza o ultrassom como pré tratamento antes da reação enzimática, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas e assim consequentemente aumentar a área de superfície catalítica, reduzindo possíveis problemas de transferência de massa. O segundo caso é a utilização do ultrassom na reação enzimática, neste caso a energia de cavitação acelera a velocidade da reação, portanto altera as constantes de reação, mas o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre não é claro, acreditasse que o aumento da circulação do líquido, aumente o

acesso do substrato aos sítios ativos da enzima (DELGADO-POVEDANO E LUQUE DE CASTRO, 2015).

A utilização do ultrassom como pré-tratamento propiciou melhoras significativas na constante cinética aparente de reação de produção do lipídeo 1,3 - dioleoyl-2-palmitoylglycerol a partir de tripalmitin e ácido oleico, mostrou melhor desempenho da enzima e o aprimoramento da afinidade entre o substrato e enzima (LIU et al. 2015). Os resultados apresentados por Ramón et al (2015) demonstram o potencial de utilização do ultrassom em reações hidrolíticas enzimáticas, visto que houve um incremento de 32% na quantidade de açúcares fermentescíveis quando da utilização desta tecnologia associada a temperatura de tratamento.

A utilização do ultrassom pode reduzir problemas relativos a transferência de massa em sistemas enzimáticos, melhorar a estabilidade e atividade das enzimas. Estudos direcionados a utilização das amilases na conversão de resíduos agroindustriais ricos em amido, para a obtenção de açúcares para a produção de bioetanol, tem demonstrado o potencial de utilização desta tecnologia (SOUZA et al., 2013).

A ação do ultrassom sobre o comportamento enzimático é influenciada por algumas variáveis como a frequência utilizada, potência do equipamento, bem como a intensidade usada no tratamento. Entretanto, resultados experimentais demonstram grande variabilidade no comportamento da enzima quanto ao uso de frequência quando tratada com diferentes dispositivos de ultrassom (DELGADO-POVEDANO E LUQUE DE CASTRO, 2015) sugerindo assim a necessidade de pesquisas voltadas a elucidação da série de dúvidas relativas a aplicação desta ferramenta no que concerne principalmente esta variável.

Alguns estudos têm mostrado a versatilidade desta ferramenta, sendo que as ondas ultrassônicas podem vir a resultar no incremento na atividade enzimática. Leaes (2012), mostrou que o uso do ultrassom, resultou em uma redução na energia de ativação na reação hidrolítica de amido solúvel utilizando as enzimas glicoamilase e α -amilase, observou-se um aumento na energia cinética molecular, logo maior eficiência enzimática, sugerindo assim que está ferramenta possa causar alterações na estrutura conformacional enzimática melhorando sua atividade ou causando danos e até a desnaturação das mesmas.

2.4.2 Micro-ondas

Muitos estudos têm sido realizados sobre a utilização de micro-ondas visando

um amplo campo de aplicações em diferentes áreas. As micro-ondas geram calor no interior do sistema reacional, facilitando as operações de transferência de calor e massa, acelerando a ocorrência de determinadas reações, inclusive àquelas catalisadas por enzimas.

Porém, da mesma forma que no caso do uso de ultrassom, previamente a reação propriamente dita, deve-se avaliar o comportamento da atividade enzimática quando o biocatalisador é exposto as micro-ondas.

Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em forno de micro-ondas doméstico surgiram em 1986 em dois trabalhos independentes de Gedye et al. (1986) e Guigere et al. (1986). As reações foram conduzidas em frasco selado com uma comparação com o aquecimento convencional. Uma notável redução no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão.

Na literatura, diversas reações orgânicas conduzidas com sucesso em forno de micro-ondas doméstico sem modificação, e com segurança são relatadas por diferentes autores (MINGOS et al., 1991; CADDICK, 1995; BOSE et al., 1997; VARMA, 1999). A utilização de reatores, digestores e fornos modificados também foram investigadas após algum tempo (STRAUSS e TRAINOR, 1995; LOUPY et al., 1998).

Segundo Lopes et al. (2015), a irradiação de micro-ondas oferece um método limpo, barato, e conveniente de aquecimento, o que é uma maneira alternativa de fornecer energia para sistemas químicos. Os efeitos de micro-ondas em reações químicas estão relacionadas ao atrito molecular de curto alcance devido à polarização contínua de moléculas causada pela irradiação de micro-ondas. Esse processo de dipolos ordenados (com campo eletromagnético) e desordenados (sem o campo) aumenta o atrito entre as moléculas, aumentando a temperatura no local e as taxas de reação.

O aquecimento de líquidos usando micro-ondas pode ser explicado pela interação da matéria com o campo eletromagnético da radiação incidente, causando movimento de íons assim como de dipolos induzidos ou permanentes. O movimento dessas espécies causa geração de calor (o chamado aquecimento dielétrico) por dois mecanismos: rotação de dipolo, que se relaciona com o alinhamento de moléculas que possuem dipolos permanentes ou induzidos com o componente de campo elétrico da radiação, e condução iônica, que se refere à migração de íons dissolvidos devido ao campo eletromagnético oscilante.

Além do rápido aquecimento dos materiais, alguns autores consideram que as micro-ondas podem gerar efeitos específicos (não apenas térmicos) geralmente

conectados com a absorção seletiva de energia de micro-ondas por moléculas polares. De acordo com esse conceito, a irradiação de micro-ondas resulta numa mudança das propriedades termodinâmicas dos sistemas reativos, podendo resultar em aumento na atividade enzimática ou causando danos e até a desnaturação destas proteínas.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pode ser observado na literatura atual, poucos relatos avaliam as mudanças em termos de atividade enzimática após exposição ao ultrassom e as micro-ondas. Especificamente sobre lipase e peroxidases os mesmos tratam da aplicação destes sistemas em reações enzimáticas e não na avaliação do comportamento da atividade da enzima quando esta é exposta a diferentes sistemas reacionais, o que acabou motivando a realização da proposta apresentada.

As técnicas de tratamentos de enzimas em ultrassom e micro-ondas vêm se destacando nos últimos anos, pois estão sendo usadas para melhorar o processo de extração enzimática ou no tratamento conjunto da enzima e substratos em reações enzimáticas. Acredita-se assim, que os resultados obtidos serão de extrema relevância na área específica, pois mudanças conformacionais e/ou estruturais poderão alterar a especificidade das enzimas avaliadas, bem com suas atividades, podendo assim contribuir na atividade catalítica quando se visa posterior uso no tratamento de efluentes e na degradação de micotoxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos materiais utilizados, aparato experimental e os procedimentos adotados para obtenção dos dados experimentais.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

As amostras de farelo de arroz (FA) e farelo de soja (FS) foram adquiridas no comércio local, acondicionadas em embalagem apropriada à temperatura de 4 °C até sua utilização para a extração da enzima peroxidase. As peroxidases comerciais foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

Para a produção da enzima lipase foi utilizada torta de canola resultante do processo de extração do óleo de canola. Afim de se obter a melhor atividade possível utilizou-se as condições de fermentação otimizadas, pelo grupo de pesquisa e apresentadas no trabalho de Sbardelotto et al., (2013).

3.2 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE

3.2.1 Caracterização química dos farelos

O teor de umidade foi determinado empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C (Método n° 935.29). Os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo (Método n° 920.85); a determinação de cinzas por método gravimétrico, através de incineração das amostras em mufla a 550°C (Método n° 923.03); os níveis protéicos foram determinados pelo Método de Micro-kjeldahl, n° 920.87 e o teor de fibra bruta segundo o Método n° 991.43, todos da A.O.A.C. (2000).

Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença, considerando o somatório dos teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

3.2.2 Estudo de extração da enzima

A extração da enzima peroxidase foi realizada a partir dos subprodutos agroindustriais, FA e FS. As condições iniciais para extração da enzima foram baseadas em método descrito por Cardinali et al. (2011), onde, o meio tamponante (fosfato de sódio) extrator a uma concentração de 5 mmol L⁻¹ foi adicionado aos farelos em um

volume de 50 mL, seguido de agitação mecânica por 60 min a temperatura ambiente, para rompimento da estrutura celular e solubilização proteica.

Os extratos enzimáticos brutos provenientes dos diferentes experimentos foram centrifugados a $3220 \times g$ por 10 min a uma temperatura de 4 °C, sendo os sobrenadante filtrados e utilizados para quantificação da proteína solúvel e da atividade específica da peroxidase em cada um deles.

3.2.3 Medida de atividade da enzima

A determinação da atividade específica foi realizada a partir do método de Devaiah e Shetty (2009). O meio reacional foi constituído por 2 mL de água, 1,5 mL de tampão fosfato, 0,5 mL de guaiacol $0,080 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mL de H_2O_2 0,08%. A transmitância dos compostos oxidados foi obtida em espectrofotômetro a 470 nm. A atividade enzimática foi estimada em termos de atividade específica, através da reação de oxidação do substrato a tetraguaiacol, caracterizado pela coloração laranja. Uma unidade de atividade específica da enzima peroxidase foi definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto (GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2010).

A atividade residual (AR) foi obtida com a seguinte expressão:

$$AR = \frac{\text{atividade enzimática após tratamento}}{\text{atividade enzimática antes do tratamento}} \times 100$$

(Equação 1)

3.2.4 Pré-purificação e purificação de enzima

A pré-purificação partiu da filtração do extrato enzimático e precipitação da enzima peroxidase. Ao filtrado foi adicionada acetona, e a mistura foi mantida durante 24 horas a 8 °C, seguido de centrifugação. O precipitado foi dissolvido com tampão fosfato de concentração salina e pH otimizados durante processo de extração enzimático.

No processo de purificação a solução tampão contendo o extrato enzimático pré-purificado foi eluída por coluna cromatográfica de filtração em gel, empacotada com Sephadex G-100 da Sigma-Aldrich. Alíquotas de 2 mL foram recolhidas acompanhado pela absorvância a 280 nm e a atividade enzimática da enzima. A separação das moléculas de proteína foi de acordo com seu tamanho molecular efetivo. Para finalizar,

a caracterização da massa molecular da enzima peroxidase purificada obtida de farelo de arroz e de soja foi realizada através da separação proteica em eletroforese em gel de poliacrilamida comparada a marcadores moleculares (HOLSCHUC, 2000; WHITAKER, 1963; ROUSHDY et al., 2011; NEVES, 2002; LIN et al., 1996; ZHANG et al., 2010; SRINIVAS et al., 1999).

3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS PEROXIDASES EM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS

Tanto para a enzima comercial como para a extraída dos coprodutos da agroindústria, foram avaliados o comportamento da atividade antes e após submetidas aos testes reacionais utilizando ultrassom e micro-ondas.

3.3.1 Avaliação do comportamento das enzimas peroxidases quando submetidas a ultrassom

O equipamento utilizado nestes experimentos foi a Lavadora Ultra-Sonica UNIQUE, modelo USC-1800 A, frequência US 40KHz e potência máxima de 137W (0,42 W/cm²). Os efeitos da temperatura e da potência do ultrassom sobre a atividade das peroxidases foram determinados por meio de um planejamento de experimentos. Para avaliar os efeitos do ultrassom sobre a atividade das enzimas foram realizados testes na presença e ausência de irradiação em ultrassom.

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para avaliar os efeitos da temperatura e da potência na faixa de 30-80 °C e 0-60 %, respectivamente. A atividade foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.3.

O tempo de exposição das enzimas nas condições pré-determinadas pelo planejamento de experimental foi determinado através da realização de uma cinética em banho de ultrassom, sendo a faixa de tempo, correspondente a máxima atividade enzimática, de 10 a 20 minutos. Fixou-se então, em 10 minutos o tempo de exposição da enzima nas condições previamente determinadas pelo planejamento experimental. Todos os resultados foram analisados utilizando Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.3.2 Avaliação do comportamento das enzimas peroxidases em micro-ondas

Amostras de peroxidases não comerciais extraídas de farelo de soja, farelo de arroz e peroxidase tipo VI obtida de raiz forte foram adicionadas em tampão fosfato pH 7,5 5 mM. Estas amostras foram tratadas em micro-ondas por 5, 10 e 15 segundos, onde as temperaturas equivalentes foram: 25 °C, 50 °C e 70 °C, respectivamente. A atividade enzimática destas enzimas foi determinada antes e após o tratamento para fins de comparação.

3.4 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LIPASE

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi isolado e fornecido por Rigo (2009). O fungo foi identificado através da análise da DNA (ácido desoxirribonucleico), como sendo *Aspergillus niger*. A identificação foi realizada na Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Solos, sendo este o micro-organismo usado no desenvolvimento do presente trabalho.

3.4.1 Preparo do Meio para Fermentação (FES)

O meio de fermentação foi composto de 10g de torta de canola em béqueres de polipropileno (600mL). Nestes foi adicionada a suplementação de nitrogênio (2% de ureia) diluindo-a em água destilada em quantidade para ajustar o teor de umidade em 60%. Após a diluição adicionou-se a solução de suplementação por gotejamento com o auxílio de uma pipeta manual a fim de cobrir toda a superfície da torta. Posteriormente, os béqueres foram cobertos com manta acrílica e papel alumínio e então autoclavados por 15 minutos a 1 atm (SBARDELOTTO et al., 2013).

Após a esterilização do meio, na câmara de fluxo laminar, os béqueres foram inoculados com suspensão de esporos de concentração pré-determinada pela contagem de esporos (2×10^8 esporos/g de torta seca). O volume de inóculo foi diluído em solução Tween 80 0,1% (v/v) e desta solução utilizou-se 5mL para inoculação do meio. Os béqueres foram levados para a fermentação na incubadora a uma temperatura de 27°C e retirados após 48h (SBARDELOTTO et al., 2013).

3.4.2 Obtenção do Extrato Enzimático Bruto

Após o período de fermentação, primeiramente o meio foi macerado retirando-se duas frações do meio fermentado para determinação do pH e umidade da amostra (1g e

0,5g), respectivamente. O restante do meio foi pesado e transferido para um erlenmeyer (250mL) e adicionado 45mL de tampão fosfato de sódio (pH 8,00; 100mM) realizando assim, a extração da enzima em agitador orbital com velocidade de 150 rpm a uma temperatura de 50°C por 30 minutos. O sobrenadante foi obtido através de prensagem manual com o auxílio de um filtro de nylon, sendo este utilizado para dosagem lipásica (VENTURIN et al., 2013).

3.4.3 Determinação da Atividade Hidrolítica

A determinação da atividade da enzima foi realizada através da preparação de uma emulsão contendo, óleo de oliva (10% p/v), goma arábica (5% p/v) e tampão fosfato de sódio (pH 7,0; 100mM). Em triplicata, utilizando béqueres de 100mL adicionou-se 18mL desta emulsão e 2mL do sobrenadante. A reação foi conduzida em agitador orbital com velocidade de 150 rpm a uma temperatura de 35°C por 32 minutos. Decorrido o tempo de reação, adicionou-se 20mL de acetona/etanol (1:1) (v/v) para interromper-se a reação de liberação dos ácidos graxos. Paralelamente as amostras, preparavam-se os brancos reacionais, contendo 18mL de emulsão, aos quais se adicionava primeiramente a acetona/etanol (20mL) e após os 2mL de sobrenadante, para que não houvesse reação. Todas as amostras foram tituladas pelo método potenciométrico com solução de NaOH \approx 0,05M até atingir pH 11,0. A solução de NaOH era padronizada utilizando-se titulação com biftalato de sódio. Uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições de reação (CAVALCANTI et al, 2005).

3.5 AVALIAÇÕES DO COMPORTAMENTO DA ENZIMA LIPASE EM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS

3.5.1 Avaliação do comportamento da enzima lipase quando submetida a ultrassom

O extrato enzimático bruto foi avaliado em banho de ultrassom em diferentes condições de temperatura, potência de ultrassom e tempo de exposição, conforme definição em planejamento experimental. Uma alíquota de 10 mL do extrato enzimático bruto foi colocado em béqueres de 25 mL e então submetido ao banho de ultrassom, variando-se as condições conforme planejamento experimental.

O efeito da radiação de ultrassom em banho térmico teve como condições das variáveis testadas a temperatura do banho térmico (30, 39, 45, 54 e 60 °C), a potência do ultrassom regulada em percentuais da potência máxima, sendo os valores testados (0, 39.6, 66, 105.6 e 132 watts) e o tempo de exposição em banho (10, 19, 25, 34 e 40 minutos).

3.5.2 Avaliação do comportamento da enzima lipase em micro-ondas

Amostras da enzima lipase foram tratadas em micro-ondas por 5, 10 e 15 segundos, onde as temperaturas equivalentes foram: 25 °C, 50 °C e 70 °C, respectivamente. A atividade enzimática destas enzimas foi determinada antes e após o tratamento para fins de comparação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados dos testes realizados para a extração e purificação da enzima peroxidase extraída de farelo de arroz (FA) e farelo de soja (FS), bem como os resultados obtidos durante os tratamentos em ultrassom e microondas das enzimas peroxidases e lipases produzida por *Aspergillus niger* em torta de canola.

4.1 EXTRAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE

4.1.1 Caracterização química dos subprodutos para extração da enzima peroxidase

A composição química do FA e do FS, utilizados para obtenção da enzima peroxidase expressos em massa seca, estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização química do farelo de arroz (FA) e farelo de soja (FS).

Amostra	Umidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Fibras (%)	Carboidratos*
FA	10,4 (1,2)**	14,6 (5,4)	10,4 (0,6)	20,8 (0,9)	3,5 (5,3)	40,3
FS	9,8 (1,5)	48,9 (1,4)	5,7 (3,3)	16,0 (10)	3,9 (4,2)	15,7

*Carboidratos estimados por diferença. **Coeficiente de variação (%) obtidos no experimento.

Os resultados mostraram que o FA apresentou uma quantidade 4,8% maior de lipídios do que o FS. Cabe salientar o alto percentual de proteína de FS, o que faz desse subproduto uma potencial fonte da enzima peroxidase. Os resultados encontrados na composição proximal de ambos os subprodutos estão dentro da faixa descrita na literatura (HUANG et al., 2005; REDONDO-CUENCA et al., 2006; MOONGNGARM, DAOMUKDA e KHUMPIKA, 2012; KADER et al., 2012).

4.1.2 Condições de extração da peroxidase

As condições de extração da enzima peroxidase adotadas neste trabalho foram as obtidas por Feltrin (2012). Sendo variáveis estudadas: tempo de extração (min), volume (mL) e pH do tampão fosfato utilizado como solvente extrator, buscando assim uma

melhor condição para obtenção da enzima peroxidase a partir de FA e FS. Os resultados obtidos por Feltrin (2012) mostram que nos ensaios conduzidos em 60 minutos, com um volume de 50 mL e pH 5, foram os que apresentaram os maiores valores em termos de atividade específica, tanto para o FA como para o FS. Sendo esta condição a utilizada neste estudo afim de extrair a enzima peroxidase, onde foi encontrada uma atividade específica de 87 U mg^{-1} para o FA e 100 U mg^{-1} para o FS.

4.1.3 Purificação da enzima

A enzima peroxidase obtida de FA e FS foi posteriormente purificada utilizando dois métodos de purificação, sendo precipitação com acetona e cromatografia líquida de exclusão molecular. Os dois métodos foram estudados para comparar a eficiência deles quanto à preservação da atividade enzimática.

4.1.3.1 Precipitação com acetona e cromatografia de exclusão molecular

O extrato bruto obtido de ambas as enzimas foi submetido à precipitação com acetona, segundo método proposto por Boer et al. (2006), foi adaptado às condições do estudo e do laboratório à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

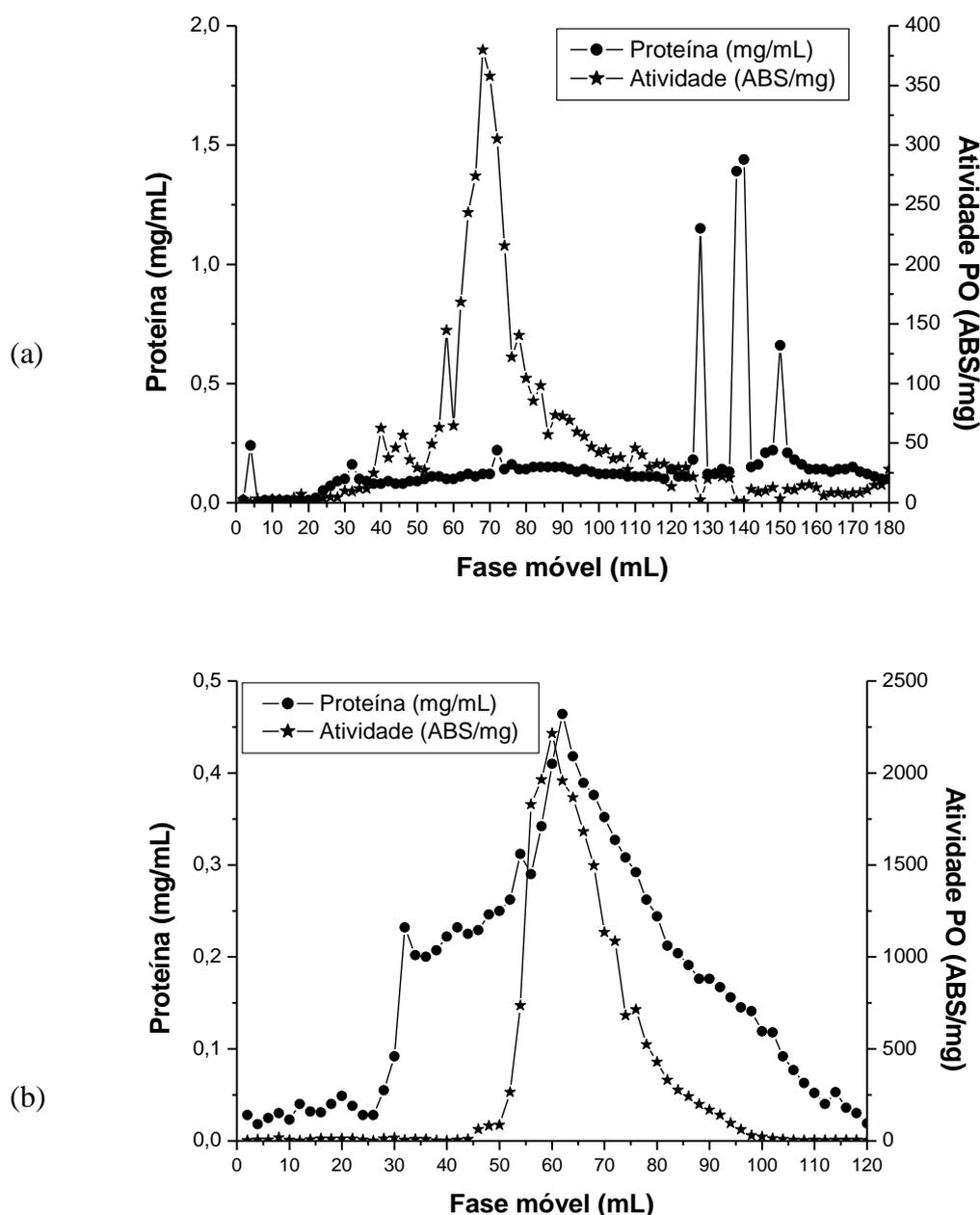
Durante a eluição cromatográfica se busca a fração proteica com elevada atividade enzimática, cuja concentração de proteínas seja a menor possível. Na Figura 1 (a) pode-se observar que em um intervalo entre as alíquotas 26 e 44 (56 a 88 mL de fase móvel) encontra-se a maior atividade da peroxidase de FA, assim como entre as alíquotas 25 e 45 (50 a 90 mL de fase móvel) encontra-se a maior atividade da peroxidase de FS, Figura 1 (b). Nos intervalos de maior atividade enzimática, as alíquotas foram recolhidas e reunidas, e nestas a atuação foi determinada por recuperação (REC) e o fator de purificação (FP) (Tabela 3).

Tabela 3. Purificação de peroxidases obtidas de FA e FS.

Fonte	Etapa de purificação	Atividade total (U_t)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg^{-1})	REC (%)	FP
FA	Extrato bruto	51103,00	1475,00	34,65	100	1,00
	Precipitação acetona	14331,70	593,10	24,16	28	0,70
	Sephadex G-	10446,15	146,15	71,48	20	2,06
FS	Extrato bruto	137731,00	760,00	181,23	100	1,00
	Precipitação acetona	116424,00	198,80	585,63	84	3,23
	Sephadex G-	27474,34	115,18	238,53	20	1,32

O processo de purificação para a peroxidase de FA não se mostrou eficiente, pois o fator de purificação na etapa de concentração por adição de acetona foi menor que 1, valor mínimo necessário para que uma etapa de purificação possa ser considerada eficiente. Este resultado se deu possivelmente pelo fato da acetona não conseguiu remover inibidores presentes no extrato enzimático. Porém, durante a purificação, pode-se observar claramente um pico de máxima atividade da enzima peroxidase, o que demonstra a necessidade de aplicar outra estratégia para concentração das proteínas. A exemplo de Ajila e Rao (2009), que empregando a cromatografia DEAE-Sephacel, antecedendo a exclusão molecular, obtiveram um fator de purificação de 44 vezes e uma recuperação de 44%.

Figura 1. Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das peroxidases de FA (a) e FS (b).



Um comportamento cromatográfico muito semelhante ao encontrado para peroxidase de FS foi encontrado para a peroxidase obtida de óleo de palma por Deepa e Arumugan (2002), quando utilizaram três etapas para purificação sendo a última o emprego de cromatografia de exclusão molecular com uma coluna de Sephadex G-100.

Os resultados para as purificações de ambos os extratos, em termos de recuperação, sugerem que o Sephadex G-100 removeu alguns componentes de baixa massa molecular necessários para a atividade enzimática, assim como mostrado por Mdluli (2005) que encontrou um percentual de recuperação de 25 %, para peroxidase de *Sclerocarya birrea* (fruta africana), após 3 etapas de purificação. Manu e Rao (2009) após 4 etapas de purificação alcançaram uma recuperação de 17 % de peroxidase obtida de farelo de trigo.

4.2 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS PEROXIDASES EM SISTEMAS REACIONAIS

4.2.1 Tratamentos em ultrassom das enzimas peroxidase comercial e não comercial

Os tratamentos realizados com ultrassom foram avaliados utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , cuja matriz e respectivos resultados estão apresentados na Tabela 4. Nela estão contidos os valores reais e codificados para as variáveis independentes (potência e temperatura) e as respectivas respostas em termos de atividade relativa para as peroxidases extraídas de farelo de arroz (FA), farelo de soja (FS) e para a enzima peroxidase comercial extraída de raiz forte.

As maiores atividades relativas foram obtidas no ponto central, 129,52 % FA e 147,89 % FS, utilizando uma temperatura de 55 °C e uma potência de 30 %. O ponto central para ambas as respostas apresentou uma pequena variação, indicando boa reprodutibilidade do processo. Para a enzima peroxidase extraída de FA as menores atividades relativas foram encontradas nos ensaios 8 (2,38 %) seguido do ensaio 4 (7,14 %) e do ensaio 3 (11,90 %). Esses resultados se deram possivelmente devido às altas temperaturas empregadas durante a execução destes ensaios, provocando assim uma desnaturação da enzima (SANTIN, 2013). Já para a peroxidase extraída de FS não ocorreram variações significativas na atividade relativa desta enzima.

No caso da peroxidase comercial foi observada uma pequena variação da atividade enzimática (99,11% – 103,21%) em todos os ensaios realizados. Estes

resultados quando comparados com as enzimas não comerciais, demonstram que o incremento de atividade foi inferior em relação a estas, o que acaba tornando estas enzimas menos eficazes além de possuírem um custo mais elevado.

A partir dos resultados apresentados foi observado que o comportamento da atividade enzimática das peroxidase é modificado quando tratada em ultrassom. As atividades relativas obtidas demonstraram que em condições médias de temperatura (50 °C) e de potência (30 %) é onde se tem os melhores resultados para as enzimas extraídas de FA e FS.

Tabela 4. Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade relativa das peroxidases. Atividade inicial peroxidase FA = 440 U/mL, peroxidase FS = 740 U/mL, peroxidase raiz forte = 539,66 U/mL.

Ensaio	Potência ultrassom (%)	Temperatura (°C)	Atividade Relativa FA(%)	Atividade Relativa FS(%)	Atividade Relativa Peroxidase Raiz Forte(%)
Enzima Bruta	-	-	100	100	100
1	-1 (10)	-1 (37)	121,43	121,36	99,55
2	1 (50)	-1 (37)	128,57	124,27	99,33
3	-1 (10)	1 (73)	11,90	124,27	99,72
4	1 (50)	1 (73)	7,14	111,65	99,50
5	-1,41 (0)	0 (55)	71,43	135,92	101,22
6	1,41 (60)	0 (55)	123,81	121,36	102,83
7	0 (30)	-1,41 (30)	114,29	142,72	101,50
8	0 (30)	1,41 (80)	2,38	107,77	99,11
9	0 (30)	0 (55)	116,67	146,60	102,77
10	0 (30)	0 (55)	126,19	148,54	101,16
11	0 (30)	0 (55)	135,71	148,54	103,21

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação de modelos empíricos para a atividade relativa das enzimas extraídas de FA e FS em função da potência e da temperatura utilizadas. Para a enzima comercial de raiz forte, não foi possível a validação do planejamento, possivelmente por apresentar resultados similares. A Tabela 5 apresenta os modelos codificados para as atividades relativas do FA e o FS em ultrassom.

Tabela 5. Modelos propostos para a atividade relativa da enzima peroxidase extraída do FA e do FS em função da potência do ultrassom (%) e a temperatura (°C).

Peroxidase	Modelo: $Y_{CAL} =$
FA	$126,31 + 9,55 * P - 17,01 * P^2 - 48,73 * T - 36,77 * T^2 - 2,97 * P * T$
FS	$147,92 - 3,97 * P - 11,31 * P^2 - 7,40 * T - 13,02 * T^2 - 3,88 * P * T$

Sendo Y_{CALC} a atividade relativa da enzima (%), P e T são a potência e a temperatura utilizadas no tratamento com ultrassom, respectivamente.

Analisando as equações da Tabela 5 podemos observar que as atividades relativas tanto do FA como do FS são dependentes da potência e da temperatura utilizadas.

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 6, foi empregada para a validação dos modelos matemáticos codificados usados para o tratamento da enzima peroxidase em ultrassom. O valor de F indica a significância de cada fator do modelo. Os modelos propostos foram validados por meio da análise de variância (ANOVA), apresentando coeficientes de correlação (R) 0,94 para a peroxidase extraída de FA e 0,86 para a peroxidase extraída de FS, com um valor de F calculado maior do que o F tabelado, com 95 % de confiança.

Tabela 6. Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade relativa das peroxidases.

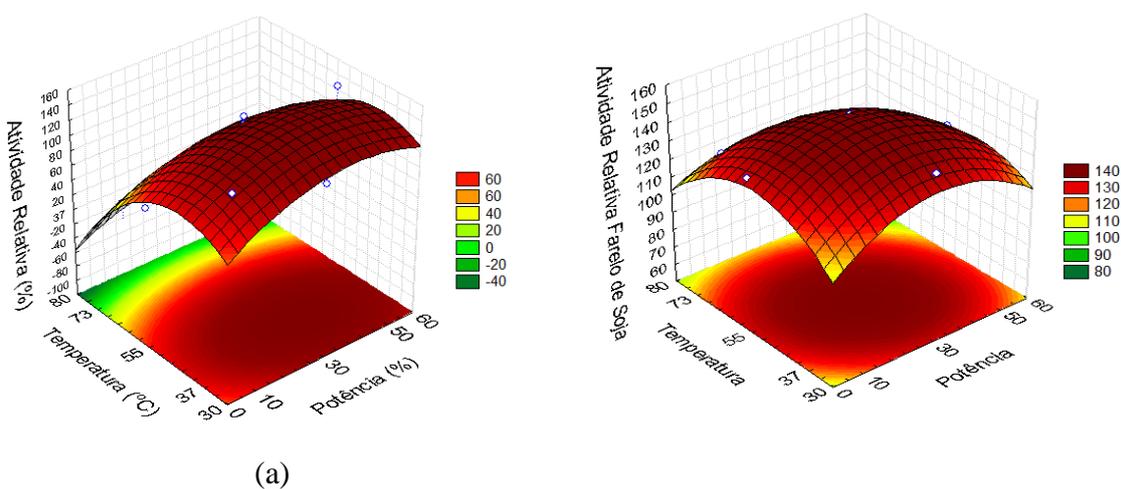
Enzimas		Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
FA	Regressão	27528,62	5	5505,72	16,27
	Resíduos	1692,15	5	338,43	
	Total	29220,78	10		
FS	Regressão	1907,65	5	381,53	6,40
	Resíduos	297,68	5	59,53	
	Total	2205,33	10		

$$F_{tab\ 5,5,95\%} = 5,05$$

As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos validados para a atividade relativa das enzimas extraídas do FA e FS estão apresentadas na Figura 2. De acordo com as superfícies de respostas, a atividade relativa da enzima peroxidase extraída de FA é mais dependente da potência utilizada em relação a temperatura. Já a

atividade relativa da enzima peroxidase extraída de FS é dependente tanto da potência quanto da temperatura utilizada. Demonstrando que em potências e temperaturas intermediárias foi onde se obteve maiores atividades relativas.

Figura 2. Superfícies de resposta para avaliação do comportamento da atividade relativa da enzima peroxidase obtida de FA (a) e FS (b).



O comportamento verificado em relação à temperatura é parcialmente explicado no trabalho de Wang et al. (2011), que afirmou que a sonicação de um líquido provoca dois efeitos principais, cavitação e aquecimento. A tensão de cisalhamento causada pelo colapso de bolhas pode promover ligeiramente um aquecimento que não é medido, devido à posição do sensor, o que pode resultar num aumento da temperatura no local, o que conduz a efeitos menos pronunciados da temperatura na atividade da enzima na presença de ultrassom.

Observa-se uma lacuna na literatura em relação ao uso de ultrassom visando incremento na atividade de peroxidases, porém os resultados obtidos neste trabalho assemelham-se aos encontrados para outras enzimas, como é o caso de Souza et al. (2013) que avaliaram a atividade da enzima comercial amilase sob a irradiação de ultrassom. Para isso, utilizaram um planejamento de experimentos onde avaliaram a temperatura de exposição e o pH em relação a atividade enzimática na presença e ausência de irradiação ultrassônica. Os resultados demonstraram que o ultrassom alterou o comportamento da enzima, a qual apresentou atividades superiores quando comparado com a ausência de ultrassom.

4.2.2 Tratamentos em micro-ondas das enzimas peroxidases comercial e não comercial

Os resultados obtidos para o tratamento realizado com micro-ondas, a fim de ativar as enzimas peroxidases comerciais e não comerciais estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Atividades residuais das enzimas peroxidases comerciais e não comerciais quando tratadas em micro-ondas.

Ensaio	Tempo (segundos) T°C	Atividade Relativa Farelo de Arroz(%)	Atividade Relativa Farelo de Soja(%)	Atividade Relativa Raiz Forte(%)
1	5 (25°C)	95,06	96,36	82,92
2	10 (50°C)	107,45	94,68	81,07
3	15 (70°C)	26,37	91,04	80,61

* Atividade inicial peroxidase FA = 440 U/mL

* Atividade inicial peroxidase FS = 740 U/mL

* Atividade inicial peroxidase raiz forte= 539,66U/mL

A maior atividade relativa foi observada no ensaio 2 (107,45%) para a enzima peroxidase extraída de FA, com um tempo de tratamento/ativação de 10 segundos e uma temperatura de aproximadamente 50°C. Outros autores também observam ativação de peroxidase vegetal depois de tratamento térmico. Ciou et al. (2011) estudaram o efeito do calor sobre a atividade da peroxidase do pericarpo de castanhas de água (*Trapa Taiwanensis* Nakai). A atividade da peroxidase, originalmente de 38 unidades/g de amostra, aumentou levemente nas amostras aquecidas de 30 a 40°C por 10-60 min. Além disso, a atividade da peroxidase aumentou rapidamente quando as amostras foram tratadas a 50-60°C por 10-60 min. A maior atividade da peroxidase foi a 60°C, com 30 min de tratamento térmico. A peroxidase neste vegetal foi quase completamente inativada quando a temperatura foi aumentada para 100°C em 10 min.

Lopes et al. (2015) sugeriram que nas temperaturas de 30 e 45°C as interações no estado nativo são maximizadas, mantendo nos mesmos valores os ângulos de torção e das cadeias polipeptídicas e baixa entropia, explicando a auto ativação da enzima.

Como pode ser observado na Tabela 7, o tratamento com micro-ondas provavelmente fez com que ocorressem alterações na estrutura secundária, as quais ocorrem em sítios específicos da enzima e dependem da temperatura à qual se encontra exposta, sugerindo um comportamento similar a o obtido por Lopes et al. (2015).

Pequenas alterações na estrutura secundária da enzima a baixas temperaturas (30-45°C) têm efeito de ativação, enquanto a temperaturas mais elevadas o efeito sobre

a enzima é deletério sobre a sua atividade, conforme pode ser observado no ensaio 3 para a enzima extraída de farelo de arroz. A comparação dos resultados obtidos com a literatura não foi possível, pois esse tipo de sistema somente é utilizado para inativação de enzima neste momento. O que torna este trabalho uma tecnologia promissora para o incremento da atividade enzimática.

4.3 AVALIAÇÃO DA ENZIMA LIPASE EM SISTEMAS REACIONAIS

O comportamento da atividade enzimática da lipase foi avaliado em sistemas assistidos por ultrassom. Para tal, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³. A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento realizado (valores reais e codificados), bem como os valores de atividade.

Tabela 8. Matriz do DCCR realizado (valores codificados e reais) e valores de atividade relativa obtidos para a enzima lipase após tratamento em ultrassom.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (%)	Atividade Relativa (%)
1	-1(19)	-1 (39)	-1 (30)	0
2	1 (34)	-1 (39)	-1 (30)	169
3	-1 (19)	1 (54)	-1 (30)	0
4	1 (34)	1 (54)	-1 (30)	152
5	-1 (19)	-1 (39)	1 (80)	161
6	1 (34)	-1 (39)	1 (80)	0
7	-1 (19)	1 (54)	1 (80)	0
8	1 (34)	1 (54)	1 (80)	69
9	-1,68 (10)	0 (45)	0 (50)	55
10	1,68 (40)	0 (45)	0 (50)	0
11	0 (25)	-1,68 (30)	0 (50)	17
12	0 (25)	1,68 (60)	0 (50)	91
13	0 (25)	0 (45)	-1,68 (0)	0
14	0 (25)	0 (45)	1,68 (100)	0
15	0 (25)	0 (45)	0 (50)	307
16	0 (25)	0 (45)	0 (50)	306
17	0 (25)	0 (45)	0 (50)	344

Através da análise da Tabela 8 pode-se constatar que o ponto central do planejamento foi à condição que apresentou maior incremento de atividade, com valores que em média apresentam-se 319 % maiores que a atividade do extrato bruto antes do tratamento. A condição do ponto central apresenta um tempo de exposição ao ultrassom de 25 minutos, temperatura do banho de 45°C e potência do ultrassom de 66 W, ou seja, 50% da potência máxima que pode ser fornecida pelo equipamento. Valores elevados de

temperatura, potência do ultrassom e tempo de exposição resultaram em inativação parcial ou total das lipases.

Estudos encontrados na literatura trazem que este comportamento apresentado pela enzima no nível superior de temperatura e potência pode estar relacionado ao efeito sinérgico da temperatura e as ondas ultrassônicas. Wang (2011) descreve a possibilidade de ocorrer à desnaturação da enzima, devido ao fato de a sonificação do líquido resultar em um aumento na temperatura, bem como estimular o processo de cavitação. No entanto, ainda existem muitas dúvidas para serem elucidadas quanto ao efeito do ultrassom no tratamento de enzimas, visto que, o trabalho desenvolvido por Laes (2013) relata o efeito positivo com o aumento da temperatura quando aplicadas a enzimas amilolíticas.

No presente estudo verificou-se que valores elevados de temperatura, potência do ultrassom e tempo de exposição resultaram em inativação parcial ou total das lipases.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e foram utilizados para construir o modelo matemático codificado (Equação 2) que foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 9.

Atividade Relativa

$$= 314,73 + 9,49 * \text{Tempo} - 89,81 * \text{Tempo}^2 + 1,14 * \text{Temperatura} - 80,46 * \text{Temperatura}^2 - 6,67 * \text{Potência} - 99,56 * \text{Potência}^2 + 26,54 * \text{Tempo} * \text{Temperatura} - 51,54 * \text{Tempo} * \text{Potência} - 9,41 \text{Temperatura} * \text{Potência}$$

(Equação 2)

Tabela 9. Análise de Variância aplicada ao modelo apresentado na Equação 2.

Causa de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc
Regressão	204240,9	9	22693,4	5,1
Resíduo	31224,1	7	4460,5	
Falta de ajuste	30279,0	5		
Erro Puro	945,2	2		
Total	235465,1	16		

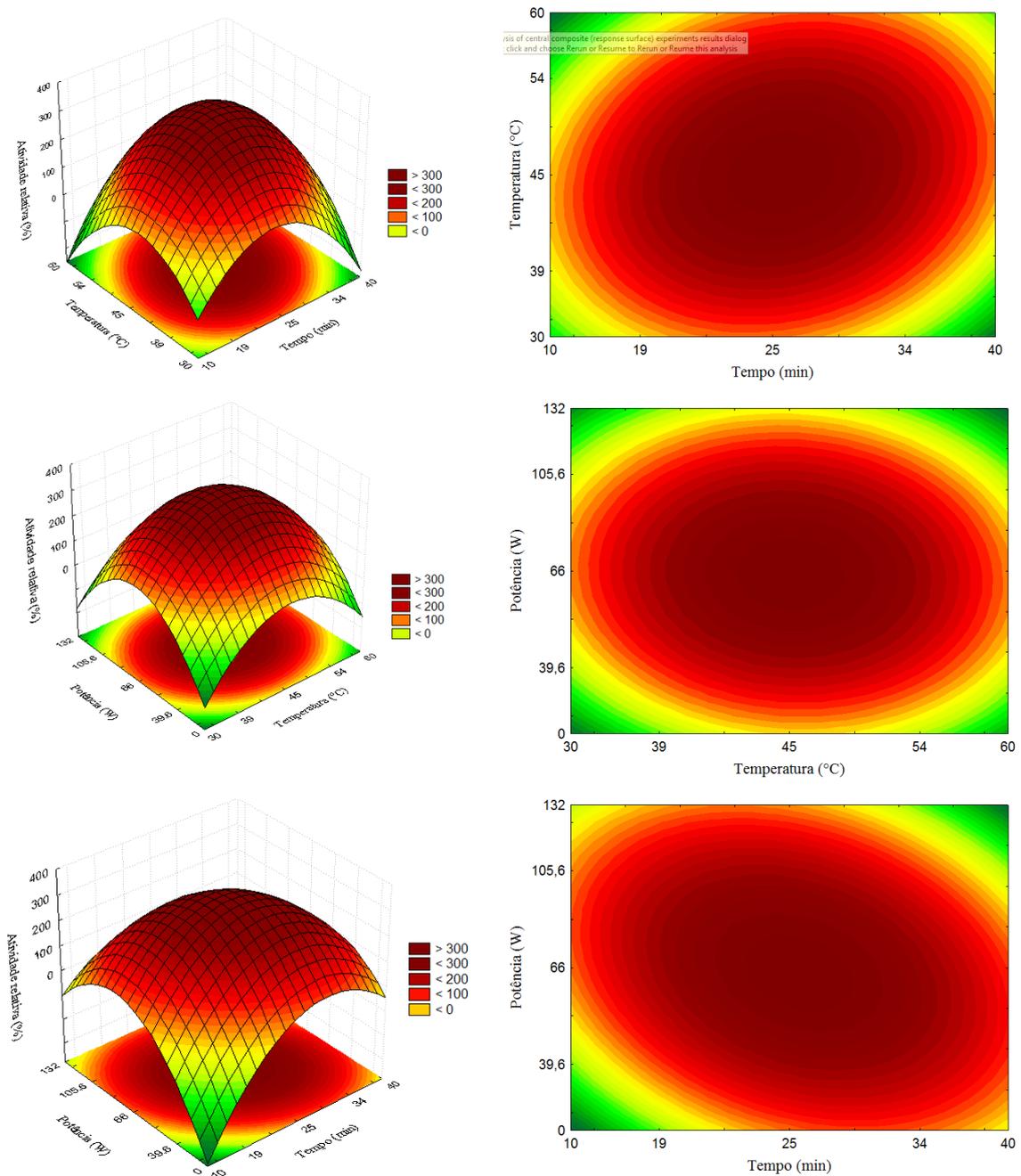
F tabelado 95%; 9;7=3,67
R²=0,86

Após análise da Tabela 9, verifica-se que o modelo é válido com 95% de confiança, visto que o F calculado é superior ao F tabelado e o coeficiente de determinação obtido foi de 86%. Através da validação do modelo pode-se confirmar as melhores condições para a utilização do ultrassom no tratamento da enzima lipase

produzida pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando a torta de canola como substrato.

A validação do modelo permitiu a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 3, as quais permitem concluir que, na faixa estudada das três variáveis, o processo encontra-se otimizado.

Figura 3. Superfícies de respostas para exposição do extrato bruto ao banho termostático ultrassônico.



Observando a Figura 3, é possível constatar que valores de tempo, temperatura e potência de ultrassom utilizados na região em torno do ponto central produziram os melhores resultados de ativação das lipases produzidas pelo micro-organismo.

A irradiação por ultrassom é um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima (LIN e LIU, 1995; KHAN et al., 2015; RAMÓN et al., 2015), assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas.

O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional. Porém as suas frequências de irradiação podem promover a formação de radicais livres que alteram células e enzimas presentes no meio. No caso de proteínas globulares, frequências entre 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar a hidrólise. Já para proteínas lineares essa absorção depende do conteúdo de α -hélice. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas.

Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos de tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase.

Estudos comparativos de hidrólise, catalisada por lipase, em óleo de soja em um sistema isento de solvente foram efetuadas por Liu et al, (2008). Os autores constataram que uma potência de ultrassom de 1,64 W/mL produziu efeito satisfatório na hidrólise, aumentando a taxa global de hidrólise enzimática em mais de duas vezes quando comparada a reação sem ultrassom.

Convém salientar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresentam o uso do ultrassom já na reação catalisada pela enzima, Ceni et al, (2011), Fiametti et al, (2011), Lerin et al, (2011), Khan et al, (2015) e Ramón et al, (2015).

O mecanismo de ação do ultrassom sobre lipases utilizadas na síntese de cetil oleato, demonstrou que pode ocorrer a indução da cavitação, processo de formação e aumento na colisão de cavidades ou bolhas, que afetam as regiões próximas, aumentando a temperatura e pressão, resultando na melhora da difusão do ácido oleico ao acesso a enzima, influenciando assim na taxa de reação de síntese oleato de cetil (KHAN et al., 2015). Nestes casos, o objetivo do uso seria diminuir o tempo reacional,

efeito que foi conseguido com o uso do ultrassom e em alguns casos até aumento dos rendimentos reacionais.

Pelos resultados apresentados no planejamento de experimentos realizado, fica claro que a exposição ao ultrassom, além de reduzir o tempo de reação, também está aumentando a atividade enzimática, provavelmente pela alteração conformacional da estrutura proteica, o que também poderá contribuir na redução do tempo reacional quando esta enzima for aplicada.

Trabalhos recentes, como o de Laes et al (2013), utilizando ondas ultrassônicas para avaliar o desempenho enzimático de amilases e α -amilases, demonstram que o ultrassom afeta o comportamento destas enzimas. Sendo que as mesmas respondem de forma diferente para as variáveis independentes (temperatura e pH). Verificou-se que no caso das enzimas citadas acima houve um aumento na atividade enzimática para a faixa de temperatura até 50°C em presença de ultrassom, quanto a energia de ativação destas enzimas em presença do ultrassom foi considerada reduzida, possibilitando a hidrólise do amido em temperaturas mais baixas, como a 30°C (LAES et al., 2013).

No caso das lipases não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse o efeito do ultrassom sobre a enzima individualmente com o objetivo de melhorar a sua atividade. Os encontrados relatam o uso de ultrassom no tratamento conjunto da enzima e substrato durante a reação enzimática com a finalidade de melhorar seu desempenho, como é o caso do trabalho apresentado por Liu et al (2015).

Cabe salientar que os tratamentos realizados com micro-ondas para a enzima lipase não obtiveram êxito. Em todos os tempos analisados (5, 10 e 15 segundos) a enzima foi desnaturada.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram apresentados dados experimentais a respeito dos efeitos da irradiação de ultrassom e micro-ondas sobre a atividade da enzimas lipase e peroxidases.

- O ultrassom alterou o comportamento da atividade enzimática de ambas as peroxidases. Os resultados desse estudo demonstraram que após o tratamento com ultrassom utilizando uma potência de 30 % e uma temperatura de 55 °C foi obtido um aumento da atividade relativa das peroxidases (129,52 % FA e 147,89 % FS). Esses resultados permitem definir as faixas de funcionamento das enzimas em termos de atividade residual para posterior aplicação destes como catalisadores em reações de interesse.
- O uso do ultrassom se mostrou uma tecnologia promissora para ser utilizada em reações enzimáticas devido aos seus efeitos positivos sobre as atividades das enzimas peroxidases.
- O estudo dos efeitos do tratamento com micro-ondas na atividade enzimática e em sua estrutura são essenciais para a viabilização do uso dessa técnica. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que o tratamento com micro-ondas constitui um meio de reação para a realização de reações catalisadas por peroxidases, pois foi possível obter ganho de atividade nos ensaios realizados.
- Por ser um método limpo e barato, a irradiação de micro-ondas pode ser considerada uma alternativa aos sistemas convencionais a fim de fornecer energia para sistemas químicos.
- Quanto ao uso do ultrassom no tratamento de lipases, constatou-se modificações no comportamento da enzima quanto a sua atividade hidrolítica, visto que, foi observado um incremento de aproximadamente 300 % na atividade enzimática relativa, se comparado a atividade da enzima sem o tratamento com o ultrassom.
- Também foi possível verificar a influência da temperatura e do tempo de exposição sobre a atividade enzimática, sendo as melhores condições alcançadas quando utilizou-se o ponto central do planejamento experimental que foi de temperatura de 45°C, tempo de exposição de 25 minutos e potência das ondas ultrassônicas de 50%. Isto permitiu verificar que utilizando está enzima na

condição de maior potência do ultrassom, resultou em uma possível inativação enzimática.

- Desta forma conclui-se que o uso do ultrassom pode ser uma alternativa bastante promissora na busca de melhorias na atividade hidrolítica da enzima lipase, produzida pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando torta de canola como substrato.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, podem-se sugerir os seguintes desdobramentos para estudos futuros nesta área:

- Aplicação da enzima peroxidase após exposição em banho ultrassônico em reações de interesse, como na degradação de micotoxinas e no tratamento de efluentes sintéticos.
- Aplicação da enzima lipase após tratamento em banho ultrassônico no tratamento de efluentes sintéticos e reais.
- Aplicação conjunta das enzimas peroxidase e lipase em tratamento de águas residuárias industriais.
- Imobilização das enzimas para posterior tratamento em meios reacionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL D., PATIDAR P., BANERJEE T., PATIL S.; **Production by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its applications soy protein hydrolysis.** Process biochemistry, v. 34, p. 977-981, 2004.
- AJILA, C.M.; RAO, U.J.S.P. **Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 60, p. 36-44, 2009.
- ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- AMARASINGHE, B.M.W.P.K.; KUMARASIRI, M.P.M.; GANGODAVILAGE, N.C. **Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil.** Food and Bioproducts Processing, v. 87, p. 108-114, 2009.
- APAR, D.K.; M. TURHAN, B. OZBEK, **Enzymatic hydrolysis of starch by using a sonifier,** Chem. Eng. Commun. 193, 1117–1126, 2006.
- AZEREDO, L.A.I., GOMES, P.M., SANT'ANNA JR, G., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G.,. **Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations.** Current Microbiology, v. 54, p. 361-365, 2007.
- BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. **Ultrason: influência do ultrassom na química.** Química Nova, v. 15, nº 4, p. 302-316, 1992.
- BARTON, S., BULLOCK, C., WEIR, D., **The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance.** Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 190-194, 1996.
- BATISTELLA, L.; USTRA, M.K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S.B.C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D. **Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation,** Bioprocess Biosyst. Eng. (2011), <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0573-4>.
- BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M. DE; PERALTA, R. M. **Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*.** Process Biochemistry, v. 41, p. 1203–1207, 2006.

- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, p. 506, 2008.
- BOSE, A. K.; BANIK, B. K.; LAVLISNKAIA, N.; JAYARAMAN, M.; MANHAS, M. S.; CHEMTECH 1997, 27, 18.
- CADDICK, S.; Tetrahedron 1995, 51, 10403.
- CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. **Differences in functional properties and biochemical characteristics of congeneric rice proteins**. Journal of Cereal Science. v. 50, p. 184-189, 2009.
- CARDINALI, A.; TURSI, N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M. G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; VENERE, D. D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. **Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke**. Plant Physiology and Biochemistry, v. 49, p. 395-403, 2011.
- CARVALHO, P. O. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados**. Química Nova. v. 26, p.75-80, 2003.
- CASTILHO L.R., POLATO C.M.S., BUARQUE E.A., SANT'ANNA JR. G.L., FREIRE D.M.G.; **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations**. Biochem. Eng. J., 4, 239-247, 2000.
- CAVALCANTI E.A.C., GUTARRA M.L.E., FREIRE D.M.G., CASTILHO L.R., SANT'ANNA G.L.; **Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48 p. 79-84, 2005.
- CAVALETT, O. **Análise do ciclo de vida da soja**. Tese (Tese doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- CENI, G.; DA SILVA, P. C.; LERIN, L.; CHARIN, R. M.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; DE OLIVEIRA, D. **Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane**. Enzyme and Microbial Technology, p. 513-519, 2010.
- CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F. **Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae***. The American Phytopathological Society, v. 10, p. 861-871, 1997.

- CIOU, J., LIN, H., CHIANG, P., WANG, C., CHARLES, AL. **The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment.** Food Chemistry, v. 27, p. 523, 2011.
- CONDON, B.; EASSON, M.; YACHMENEV, V.; LAMBERT, A.; DELHOM, C.; SMITH, J. **Application of a low-level, uniform ultrasound field for the acceleration of enzymatic bio-processing of cotton.** Cellulose Chemistry and Technology, v. 43, nº 9-10, p. 443-453, 2009.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase.** Tese, UFMG, 2006.
- DALMAU E., MONTESINOS J. L., LOTTI M., CASAS C.; **Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 657-663, 2000.
- DEEPA, S.S.; ARUMUGHAN, C. **Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf.** Phytochemistry, v. 61, p. 503-511, 2002.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. **Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings.** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 94, p. 119-126, 2009.
- DIAZ J.C., RODRIGUEZ J.A., ROUSSOS S., CORDOVA J., ABOUSALHAM A., CARRIERE F., BARATTI J.; **Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures.** Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.1042-1050, 2006.
- DUTRA J.C.V., TERZI S.C., BEVILAQUA J.V., DAMASO M.C.T., COURI S., LANGONE M.A.P., SENNA L.F.; **Lipase Production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing.** Applied Biochemistry Biotechnology, v. 147, p. 63-75, 2008.
- FENG, W.; JI, P. **Enzymes immobilized on carbon nanotubes.** Biotechnology ADVANCES, v. 29, p. 889–895, 2011.
- FIAMETTI, K. G.; SYCHOSKI, M. M.; DE CESARO, A. ;FURIGO JR, A.; BRETANHA, L.C.; PEREIRA, C.M.P.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free**

- lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 18, p. 981-987, 2011.
- GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E., **Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation.** Journal Brazilian Chemistry Society. 21, 710-714, 2010.
- GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J.; **Tetrahedron Lett.** 1986, 27, 279.
- GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, S. M.; MAJETICH, G.; **Tetrahedron Lett.** 1986, 27, 4945.
- HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. Food Chemistry. v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- HAMID, M.; REHMAN, K. **Potential applications of peroxidases.** Food Chemistry. v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- HOLSCHUC, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase em carambola (*Averrhoa carambola*, L.).** Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.
- HUANG, S. C.; SHIAU, C. Y.; LIU, T. E.; CHU, C. L.; HWANG, D.F. **Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs.** Meat Science, v. 70, p. 613–619, 2005.
- INDINANI, C.; FEIS, A.; HOWES, B. D.; MARZOCCHI, M. P.; SMULEVICH, G. **Effect of low temperature on soybean peroxidase: spectroscopic characterization of the quantum-mechanically admixed spin state.** Journal of Inorganic Biochemistry. v. 79, p. 269–274, 2000.
- KADER, A.; BULBUL, M.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; NGUYEN, B. T.; KOMILUS, C. F. **Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*.** Aquaculture, v. 350-353, p. 109–116, 2012.
- KARIM, Z.; HUSAIN, Q. **Guaiacol-mediated oxidative degradation and polymerization of bisphenol A catalyzed by bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 59, p. 185–189, 2009.
- KHAN, S. H.; BUTT, M. S.; SHARIF, M. K.; SAMEEN, A.; MUMTAZ, S.; SULTAN, M. T. **Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice**

- bran by microwave, dry heat, and parboiling.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 2416–2420, 2011.
- KHAN, N. R., JADHAV, S. V., RATHOD, V. K. **Lipase catalyzed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: optimization and kinetic studies.** Ultrasonics Sonochemistry, 27, 522-529, 2015.
- KIM, J.B.; GRATE, J.W.; WANG, P. **Nanostructures for enzyme stabilization.** Chemical Engineering Science, v. 61, p. 1017–1026, 2006.
- KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J. AKUNNA, J.; WALKER, G.M.; BREMMER, D.H. **Stimulation of bioprocesses by ultrasound,** Biotechnol. Adv. 29, 768–778, 2011.
- LAES, E. X., LIMA, D., MIKLASEVICIUS, L., RAMON, A. P., DAL PRÁ, V., BASSACO, M. M., TERRA, L. M., MAZUTTI, M. A. **Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2, 21-25, 2013.
- LERIN, L. A.; FEITEN, M. C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.; OESTREICHER, E. G.; DE OLIVEIRA, D. **Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation.** Ultrasonics Sonochemistry, p. 988-996, 2011.
- LI, C.; YOSHIMOTO, M.; OGATA, H; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. **Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks,** Ultrason. Sonochem. 12, 373–384, 2005.
- LIN, G. AND LIU, H. **Ultrasound-promoted lipase-catalysed reactions.** Tetrahedron Letters, 36, 6067-6068, 1995.
- LINKE, D.; BERGER, R.G. **Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes.** Journal of Biotechnology, v. 152, p. 125–131, 2011.
- LIU, Y. X., JIN, Q. Z., SHAN, L., LIU, Y.F., SHEN, W., WANG, X. G.. **The effect of ultrasound on lipasecatalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system.** Ultrason Sonochem. v.15, p. 402–407, 2008.
- LIU, S., DONG, X., WEI, F., WANG, X., LV, X., ZHONG J., WU, L., QUEK, S., CHEN, H. **Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content.** Ultrasonics Sonochemistry, 23, 100-108, 2015.

- LOPES, L. C., BARRETO, M.T.M., GONCALVES, K. M., ALVAREZ, H. M., HEREDIA, M. F., SOUZA, R. O. M. A., CORDEIRO, Y., DARIVA, C., FRICKS, A. T. **Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 69, p. 10-18, 2015.
- LOUPY, A.; PETIT, A.; HAMELIN, J.; TEXIER-BOULLET, F.; JACQUAULT, P.; MATHÉ, D.; *Synthesis* 1998, 1213.
- LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. **Rice bran: chemistry and technology.** In: LUH, B.S. **Rice: utilization.** 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, cap. 14, p. 313-363, 1991.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** *Process Biochemistry*, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; CAMARGO, M.M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR., M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. **Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation.** *Bioresource Technology*, v. 76, p. 23-27, 2001.
- MALDONADO, R. R. **Produção, Purificação e Caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.** São Paulo: 2006. Dissertação de Mestrado. UNICAMP.
- MANU, B. T.; RAO, U. J. S. P. **Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran.** *Food Chemistry*, v. 114, p. 66–71, 2009.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. **Evolution and expression of class III peroxidases.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, p. 58-65, 2010.
- MAY, S. W. **Applications of oxidoreductases.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, p. 370-375, 1999.
- MDLULI, K. **Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*).** *Food Chemistry*, v. 92, p. 311-323, 2005.
- MEIRA J. A., SANTOS M.M., LIMA V.M.G., MITCHELL D.A., KRIEGER N.; **Produção de lipases por *Burkholderia cepacia* em FES.** SINAIFERM, Florianópolis – SC, 2005.

- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JUNIOR, A. **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos**. Química Nova, v. 28, p 296-305, 2005.
- MINGOS, D. M. P.; BAGHURST, D. R.; Chem. Soc. Rev. 1991, 20, 1.
- MONTEIRO S., SASSAKI G.L., SOUZA L.M., MEIRA J.A., ARAÚJO J.M., MITCHELL D., RAMOS L.P., KRIEGER N.; **Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa DAUPE 614**. Chemistry and Physics of Lipids, v. 147, p.1-13, 2007.
- MOONGNGARM, A.; DAOMUKDA, N.; KHUMPIKA, S. **Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ**. APCBEE Procedia, v. 2, p. 7-8, 2012.
- MOTAMED, S.;GHAEMMAGHAMI, F.; ALEMZADEH, I. **Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase: Purification and Characterization**. Industrial Engineering Chemical Research, v. 48, p. 10614–10618, 2009.
- MURUCI, L. N. M. **Produção e Caracterização de Lipase de Aspergillus Niger obtida por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Resíduos da Agroindústria**. Tese, UFRRJ, 2012.
- NEVES, V. A. **Ionicallly Bound Peroxidase from Peach Fruit. An Internacional Journal Brazilian archives of biology and technology**. v. 45, n. 1, p. 7 - 16, 2002.
- NICELL, J. A.; WRIGHT, H. **A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide**. Enzyme and Microbial Technology, v. 21, p. 302-310, 1997.
- NUNES, P. M. B., MARTINS, A. B., BRÍGIDA, A. I. S., ROCHA-LEÃO, M. H. M., AMARAL, P., **Intracellular Lipase Production by Yarrowia lipolytica Using Different Carbon Sources**. Chemical Engineering Transactions, v. 38, p. 421-426, 2014.
- O'DONNELL, C.P.; TIWARI, B.K.; BOURKEC, P.; CULLEN, P.J. **Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance**, Trends Food Sci.Technol. v. 21, p. 358–367, 2010.
- PANDEY A.; **Solid-state fermentation. Biochemistry Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PARKER, D. B.; CAI, L.; KIM, K.; HALES, K. E.; SPIEHS, M. J.; WOODBURY, B. L.; ATKIN, A. L.; NICKERSON, K. W.; PATEFIELD , K. D. **Reducing**

- odorous VOC emissions from swine manure using soybean peroxidase and peroxides.** *Bioresource Technology*, v.124, p. 95–104, 2012.
- PASTORE, G. M., COSTA, V. S. R., KOBLITZ, M. G. B. **Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.*** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. **Farelo de arroz: características, Benefícios à saúde e aplicações.** *B.CEPPA*, v. 26, p. 29-40, 2008.
- RAMACHANDRAN S. PATEL A.K., MADHAVAN NAMPOOTHIRI K., FRANCIS F., NAGY V., SZAKACS G., PANDEY A.; **Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amilase.** *Bioresource Technology*, 93, 169-174, 2004.
- RAMACHANDRAN S., SINGH S.K., LARROCHE C., SOCCOL C.R., PANDEY A.; **Oil cakes and their biotechnological applications-A review.** *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2000-2009, 2007.
- RAMÓN, A. P., TASCHETTO, L., LUNELLI, F., MEZADRI, E. T., SOUZA, M., FOLETTO, E. L., JAHN, S. L., KUHN, R. C., MAZUTTI, M. A. **Ultrasound-assisted acid and enzymatic hydrolysis of yam (*Dioscorea sp.*) for the production of fermentable sugars.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, p. 98–102, 2015.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M. D.; MATEOS-APARICIO, I. **Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*).** *Food Chemistry*, v. 101, p. 1216–1222, 2006.
- ROKHINA, E.V., LENS, P., VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art.** *Trends in biotechnology*, v. 27, p. 298-306, 2009.
- ROUSHDY, M. M.; ABDEL-SHAKOUR, E. H.; EL-AGAMY, E. I. **Biotechnological approach for lignin peroxidase (LiP) production from agricultural wastes (Rice Husk) by *Cunninghamella elegans*.** *Journal of American Science*. v. 7, N. 5, p. 6-13, 2011.

- SANTIS-NAVARRO, A.;GEA, T.; BARRENA, R.; SANCHEZ, A. *Bioresource Technol.*, 120, 2011.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SAXENA R.K., SHEORAN A., GIRI B., DAVIDSON W.S. **Purification strategies for microbial lipases**. *Journal Microbiology Methodology*, v.52,1-18, 2003.
- SBARDELOTTO, M., DALL AGNOL, A., VENTURIN, B, MULINARI, J., TREICHEL, H., VARGAS, G. D. L. P. **Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus sp.*, utilizando torta de canola como substrato**. III SIMBBTEC. Londrina- PR, 2013.
- SHAH, S.; GUPTA, M. N. **The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media**. *Chemistry Central Journal*, v. 2, 2008.
- SHANG, C. Y., LI, W.X., JIANG, F., ZHANG, RF. **Improved enzymatic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on ZnO nanowires/macroporous SiO₂ microwave absorbing supports**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113, 9–13, 2015.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. **Production, purification, characterization and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVA, F. R. G. B. DA; SOUZA, M. DE; COSTA, A. M. DE S.; DA; JORGE, L. M. DE M.; PARAÍSO, P. R. **Experimental and numerical analysis of soybean meal drying in fluidized bed**. *Powder Technology*, v. 229, p. 61-70, 2013.
- SINGH, R.S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. **Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus***. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1703–1707, 2006.
- SMANIOTTO, A. **Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus***. Dissertação de mestrado, URI, 2010.
- SMITS J.P., RINZEMA A., TRAMPER J., SCHLOSSER E.E., KNOL W.; **Accurate determination of process variables in a solid state fermentation system**. *Process Biochemistry*, v.31, p. 669-678, 1996.

- SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S.; **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil.** *Biochemical Engineering Journal*, 13, 205-218, 2003.
- SOUZA, M., MEZADRI, E. T., ZIMMERMAN, E., LEAES, E. X., BASSACO, M. M., DAL PRÁ, V., FOLETTTO, E., CANCELLIER, A., TERRA, L. M., JAHN, S. L., MAZUTTI, M. A. **Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted Irradiation.** *Ultrasonic Sonochemistry*, v. 20, p. 89–94, 2013.
- SRINIVAS, N.D.; RASHMI, K.R.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. **Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration.** *Process Biochemistry*, v. 35, p. 43-48, 1999.
- STRAUSS, C. R.; TRAINOR, R. W.; *Aust. J. Chem.* 1995, 48, 1665.
- TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P. J. **Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs.** *Drug discovery today*, v. 10, p. 617-625, 2005.
- TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K. N. **Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons.** *Plant Science*, v. 136, p. 131-137, 1998.
- VARMA, R. S.; *Green Chem.* 1999, 1, 43.
- VEITCH, N. C. **Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.** *Phytochemistry*, v.65, p. 249-259, 2004.
- VENTURIN, B, MULINARI, J., SBARDELOTTO, M., DALL AGNOL, A., VARGAS, G. D. L. P., TREICHEL, H. **Estudo da extração de lipase obtida por fermentação em estado sólido utilizando como substrato torta de canola.** III SIMBBTEC. Londrina- PR, 2013.
- ZHANG, X.; FANG, A.; RILEY, C. P.; WANG, M.; REGNIER, F. E.; BUCK, C. **Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—A review.** *Analytica Chimica Acta.* v. 664, p. 101-113, 2010.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. de. **Arroz: composição e características nutricionais.** *Ciência Rural*, v. 38, p. 1184-1192, 2008.
- WANG, J., CAO, Y., BAOGUO, S., WANG, C., MO, Y. **Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic,** *Ultrasonic Sonochemistry*, v. 18, p. 534–540, 2011.
- WHITAKER, J. R. **Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex.** *Analytical Chemistry.* v. 35, p. 1950-1953, 1963.

ANEXOS

Artigo I:

**Evaluation of commercial and noncommercial peroxidases activity
under ultrasound and microwave treatment**

Simone M. Golunski¹, Marina Sbardelotto¹, Aline F. Camargo¹, Camila Dalla Rosa¹,
Bruno Venturin¹, Analise Dall Agnol¹, Daiane P. Baldissarelli¹, Jéssica Mulinari¹, Gean
D. L. P. Vargas¹, Jaqueline G. Buffon², Helen Treichel^{1*}

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Erechim, RS 135, km 72, 99700-000, Erechim, RS, Brazil.

² Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, P. O. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

*Corresponding author: helentreichel@gmail.com

Abstract

This study aimed to evaluate the activity of peroxidases (commercial and noncommercial) after exposure to ultrasound and microwave. For this, the enzymes were subjected to treatment in ultrasonic bath and also in microwave to evaluate the effects of these systems, as well as the relative activity through experimental design. The results of these studies showed that after treatment with ultrasound using a power of 30% and a temperature of 55°C was obtained an increase in relative activity of the peroxidases (129.52% rice bran, 147.89% soybean meal and 102.38% horseradish). But for the tests conducted in microwave, the activity of soybean meal peroxidase remained stable after exposure, suggesting its potential use in reactions which are conducted in this type of system. The current literature shows a lack of studies that evaluate the changes in terms of enzyme activity and stability after exposure to ultrasound and microwave, and specifically on peroxidases no scientific work was found, demonstrating how the proposed work is important for the area, since the enzymes under study may be applicable for different purposes, for example in the degradation of mycotoxins and wastewater treatment.

Keywords: peroxidase; ultrasound; microwave, activity.

Introduction

Enzymes have been used by man since antiquity in the form of animal or plant tissue extracts. Known as biocatalysts, they are employed in several industrial processes. Many enzymes, of microbial or plant origin, are used in the treatment of wastewater and industrial waste to solve specific problems (Bon et al., 2008). Among the most studied, for degradation purposes, there are the oxidative enzymes such as the peroxidases.

Peroxidases (EC 1.11.1.X) catalyze the electron oxidation of a variety of oxidizable xenobiotics using hydrogen peroxide (H_2O_2) as acceptor molecule (Tekchandani and Guruprasad, 1998; O'Brien and Tafazoli, 2005; Mathé et al., 2010). Its activity has been identified in plants, microorganisms and animals. Due to their oxidative nature, there are several areas where peroxidase could replace chemical oxidants used in current techniques (Hamid and Rehman, 2009).

Furthermore, these enzymes can be extracted from rice bran and soybean meal, which are agroindustrial by-products, economically enabling the process. For this, there is a pressing need for knowledge of the behavior of these biocatalysts in different reaction systems in order to evaluate their activity and conformational change so that they can, indeed, be efficiently used in degradative processes.

The low frequency ultrasound use has received increasing attention over the past decade for the improvement of several biotechnological processes. The use of an ultrasonic bath has advantages such as simplicity and low cost. The most apparent limitations are that the operating frequency is usually fixed and power variations can occur within the bath, therefore, the standardization of sampling sites is essential for comparative purposes (Barton et al., 1996).

For years, ultrasound has been used in various applications of biotechnology, e.g., for the purpose of cell disruption to release intracellular enzymes and organelles that are applied in industry and in medicine. Other applications include the easy transfer from the cell to the solvent, the intensification of mass transfer of cellulose and pectinase during the bioprocessing of cotton fabrics and during the oxidation of cholesterol to cholestenone by *Rhodococcus erythropolis* cells. The ultrasound appears to influence the reaction kinetics and reduce the time for esterification reactions (Rokhina et al., 2009).

It is also being developed studies on the use of microwaves, in order to improve the performance of enzymes in reactions on a wide range of applications in different areas. The microwaves generate heat inside the reaction system, facilitating mass and heat transfer operations by accelerating the occurrence of certain reactions, including those catalyzed by enzymes. The advantages of using this reaction system are the low cost and that it is considered a clean method. The effects of the microwaves in chemical reactions are related with the short-range molecular friction due to the continuous polarization of molecules caused by microwave irradiation (Herrero et al., 2008; Lopes et al., 2015).

It is believed that microwaves favor the efficiency of molecular collisions due to the orientation of polar molecules involved in the reaction. These properties make the microwave irradiation becomes an interesting tool for application in enzymatic processes, including the activation of peroxidases (Lopes et al., 2015). In this context, the aim of this study is to evaluate the effect of ultrasound and microwave in the enzymatic activity of commercial and noncommercial peroxidases extracted from agro-industrial by-products.

Material and Methods

Raw material

The rice bran and soybean meal samples were acquired in local agribusiness, packed in appropriate containers at the temperature of 4°C until the extraction of peroxidase.

Enzyme extraction study

The extraction of peroxidase was held from the agro-industrial by-products, rice bran and soybean meal. The initial conditions for enzyme extraction were based on the method described by Cardinali et al. (2011), where the extractor buffer media in a concentration of 5 mmol L⁻¹ was added to the brans, followed by mechanical agitation during 60 min at room temperature, to breakage of cellular structure and protein solubilization.

The crude enzyme extracts from the different experiments were centrifuged at 3220 x g for 10 min at a temperature of 4°C, and the supernatants were filtered to quantify the soluble protein and the specific peroxidase activity in each test.

Evaluation of enzymes behavior in ultrasound

The effects of ultrasound temperature and power on the peroxidases activities were determined by an experimental design. To evaluate the effects of ultrasound on the enzymes activity, tests were performed in the presence and absence of ultrasound irradiation. A central composite design (CCRD) was conducted to evaluate the effects of temperature and power in the range of 30-80°C and 0-60%, respectively, as shown in Table 1. The activity was determined according to the procedure described below. The exposure time of the enzymes in the conditions predetermined by the experimental

design was determined by performing a kinetic in an ultrasound bath, and the time range corresponding to maximum enzyme activity was from 10 to 20 minutes. The exposure time was fixed then, in 10 minutes, in the conditions previously determined by experimental design. All results were analyzed using the Statistica 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 95% ($p < 0.05$).

Evaluation of peroxidases behavior in microwave

Samples of noncommercial peroxidases extracted from soybean meal, rice bran and type VI peroxidase obtained from horseradish were added in phosphate buffer pH 7.5 5 mM. These samples were treated in microwave for 5, 10 and 15 seconds, where the equivalent temperatures were 25°C, 50°C and 70°C respectively.

Determination of enzymatic activity

The determination of enzyme activity was performed according to Devaiah and Shetty (2009) method. The reaction medium was composed of 2 ml of water, 1.5 mL of phosphate buffer, 0.5 mL of guaiacol 0.080 mol L⁻¹ and 1 mL of H₂O₂ 0.08%, the transmittance of the oxidized compounds was obtained in spectrophotometer at 470 nm. The enzymatic activity was estimated in terms of specific activity, through the oxidation reaction of the substrate to tetraguaiacol characterized by the orange color. One unit of peroxidase specific activity was defined as the protein mass that can cause an increase of 0.001 in absorbance unit per minute (Garda-Buffon and Badiale-Furlong, 2010).

Results and Discussion

Evaluation of enzymatic activity in ultrasound

The treatment with ultrasound was evaluated using a central composite design (CCRD) 2^2 , which matrix and respective results are shown in Table 1, that shows the real and coded values of the independent variables (power and temperature) and the respective responses in terms of relative activity to the peroxidases extracted from rice bran (RB) and soybean meal (SM). The highest activities were obtained for the center point, 129.52% RB and 147.89% SM, using a temperature of 55°C and a power of 30%. The central point for both answers showed little variation, indicating good reproducibility of the process. For the peroxidase extracted from RB, the smaller relative activities were found in tests 8 (2.38%) followed by test 4 (7.14%) and test 3 (11.90%). These results are possibly due to the high temperatures used during the execution of these tests, causing the enzyme denaturation. But for the peroxidase extracted from SM no significant variations in the relative activity of the enzyme occurred.

From these results it was observed that the behavior of the enzymatic activity of peroxidase is modified when treated with ultrasound. The relative activities obtained showed that average conditions of temperature (50°C) and power (30%) generate the best results.

The observed behavior in relation to temperature is partially explained in the study of Wang et al. (2011), which stated that the sonication of a liquid causes two main effects, cavitation and heating. The shear stress caused by collapsing bubbles may slightly promote a heating that is not measured due to the sensor position, which can

result in a local temperature increase, which results in less pronounced effects of temperature on the enzyme activity in the presence of ultrasound.

It can be noticed a gap in the literature regarding the use of ultrasound to increase peroxidase activity, but the results of this study are similar to those found for other enzymes, such as Souza et al. (2013) who evaluated the commercial enzyme amylase activity under the irradiation of ultrasound. For this, they used a design of experiments to evaluate the exposure temperature and pH in relation to enzymatic activity in the presence and absence of ultrasonic irradiation. Results showed that ultrasound changed the enzyme behavior, because it showed superior activity compared with the absence of ultrasound.

Evaluation of enzymatic activity in microwave

The results obtained from the treatment performed with microwaves in order to activate the commercial and noncommercial peroxidases are shown in Table 2. The highest relative activity was observed in test 2 (107.45%) for the peroxidase extracted from RB with 10 seconds of reaction time and a reaction temperature of about 50°C. Other authors also note activation of vegetable peroxidase after heat treatment. Ciou et al. (2011) studied the effect of heat on the peroxidase activity from water chestnut pericarp (*Trapa Taiwanensis* Nakai). Peroxidase activity, originally of 38 units/g of sample, increased slightly in pericarp samples that were heated from 30 to 40°C for 10-60 min. Furthermore, the peroxidase activity rapidly increased when the samples were treated at 50-60°C for 10-60 min. The greater peroxidase activity was at 60°C with 30 minutes of heat treatment. The peroxidase in this vegetable was almost completely inactivated when the temperature was increased to 100°C in 10 min.

Lopes et al. (2015) suggested that in the temperatures of 30 and 45°C, interactions in the native state are maximized, keeping in the same values the angles of twist and of the polypeptide chains and low entropy, explaining the self activation of the enzyme.

As can be seen in Table 2, treatment with microwave probably caused changes in secondary structure, which occur at specific sites of the enzyme and depend on the temperature to which it is exposed, according to Lopes et al. (2015). Small changes in the secondary structure of the enzyme at low temperatures (30-45°C) have activation effect, whereas at higher temperatures the effect on the enzyme is deleterious on its activity, as can be observed in the test 3 for the enzyme extracted from rice bran. The comparison of the obtained results with the literature was not possible because, currently, this type of system is only used for enzyme inactivation of the enzyme currently. What makes this work a promising technology for increasing the enzyme activity.

Conclusions

In this study, experimental data on the effects of ultrasound irradiation on the peroxidase activity extracted from RB and SM were presented. Ultrasound has changed the behavior of the enzyme activity of both peroxidases. The results of this study showed that after the treatment with ultrasound using a power of 30% and a temperature of 55°C was obtained an increase in the relative activity of peroxidases (129.52% RB and 147.89% SM). These results enable the definition of the operating ranges of the enzymes in terms of residual activity for later application of these as catalysts in reactions of interest. The usage of ultrasound proved to be a promising technology to be

used in enzymatic reactions due to its positive effects on peroxidases activities. The study of the effects of treatment with microwaves in the enzymatic activity and its structure are essential for the viability of using this technique. The data obtained in this study suggest that the treatment with microwaves is a reaction medium for conducting reactions catalyzed by peroxidases because it was possible to increase their activity during the performed tests.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES and FAPERGS for the financial support of this work and scholarships.

References

- Barton, S., Bullock, C., Weir, D., 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 190-194.
- Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L., 2008. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 506.
- Cardinali, A.; Tursi, N.; Ligorio, A.; Giuffrida, M. G.; Napolitano, L.; Caliandro, R.; Sergio, L.; Venere, D. D.; Lattanzio, V.; Sonnante, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 395-403, 2011.
- Ciou, J., Lin, H., Chiang, P., Wang, C., Charles, AL., 2011. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment. *Food Chem.*, 27, 523.
- Devaiah, S. P.; Shetty, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94, 119-126, 2009.
- Garda-Buffon, J., Badiale-Furlong, E., 2010. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. *Journal Brazilian Chemistry Society*. 21, 710-714.

- Hamid, M., Rehman, K., 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115, 1177-1186.
- Herrero, M. A.; Kremsner, J. M; Kappe, C. O. Nonthermal Microwave Effects Revisited: On the Importance of Internal Temperature Monitoring and Agitation in Microwave Chemistry, *JOC Featured Article*, 2007.
- Lopes, L. C.; Barreto, M. T. M.; Gonalves, K. M.; Alvarez, H. M.; Heredia, M. F.; de Souza R. O. M.A., Cordeiro, Y.; Dariva, C.; Fricksa, A.T. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 69, 10–18, 2015.
- Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., Dunand, C., 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500, 58-65.
- Rokhina, E.V., Lens, P., Virkutyte, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in biotechnology*, 27, 298-306.
- Souza, M., Mezdri, E. T., Zimmerman, E., Leaes, E. X., Bassaco, M. M., Dal Prá, V., Foletto, E., Cancellier, A., Terra, L. M., Jahn, S. L., Mazutti, M. A., 2013. Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted Irradiation. *Ultrason. Sonochem.*, 20, 89–94.
- Tafazoli, S., O'brien, P. J., 2005. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Drug discovery today*, 10, 617-625.
- Tekchandani, S., Guruprasad, K. N., 1998. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. *Plant Science*, 136, 131-137.
- Wang, J., Cao, Y., Baoguo, S., Wang, C., Mo, Y., 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic, *Ultrason. Sonochem.*, 18, 534–540.

Table 1. DCCR 2² matrix (real and coded values) and respective results in terms of relative activity of the peroxidases. Initial activity RB peroxidase = 440 U/mL, SM peroxidase = 740 U/mL, horseradish peroxidase = 539.66 U/mL.

Tests	Ultrasound Power (%)	Temperature (°C)	Relative Activity* RB (%)	Relative Activity* SM (%)	Relative Activity Horseradish Peroxidase (%)
Crude Enzyme	-	-	100	100	100
1	-1 (10)	-1 (37)	121.43	121.36	99.55
2	1 (50)	-1 (37)	128.57	124.27	99.33
3	-1 (10)	1 (73)	11.90	124.27	99.72
4	1 (50)	1 (73)	7.14	111.65	99.50
5	-1.41 (0)	0 (55)	71.43	135.92	101.22
6	1.41 (60)	0 (55)	123.81	121.36	102.83
7	0 (30)	-1.41 (30)	114.29	142.72	101.50
8	0 (30)	1.41 (80)	2.38	107.77	99.11
9	0 (30)	0 (55)	126.67	146.60	102.77
10	0 (30)	0 (55)	126.19	148.54	101.16
11	0 (30)	0 (55)	135.71	148.54	103.21

Table 2. Residual activities of commercial and noncommercial peroxidases treated in microwave.

Tests	Time (seconds)	Rice Bran Relative Activity (%)	Soybean Meal Relative Activity (%)	Horseradish Relative Activity (%)
1	5	95.06	96.36	82.92
2	10	107.45	94.68	81.07
3	15	26.37	91.04	80.61

* Initial activity RB peroxidase = 440 U/mL

* Initial activity SM peroxidase = 740 U/mL

* Initial activity horseradish peroxidase = 539.66 U/mL

Artigo II:**EFEITO DO ULTRASSOM NA ATIVIDADE DA ENZIMA LIPASE OBTIDA A PARTIR DO FUNGO *Aspergillus niger***

Simone M. Golunski¹, Marina Sbardelotto¹, Aline Frumi Camargo¹, Camila Dalla Rosa¹, Bruno Venturin¹, Analise Dall Agnol¹, Daiane P. Baldissareli¹, Camila Torbes¹, Gean D. L. P. Vargas¹, Altemir Mossi¹ e Helen Treichel¹

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental

E-mail para contato: helen.treichel@uffs.edu.br

RESUMO

*O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da radiação de ultrassom em banho térmico na atividade lipásica, tendo como variáveis a temperatura do banho térmico (39, 45 e 54°C), a potência de radiação fornecida pelo ultrassom (30, 50 e 80 Watts) e o tempo de exposição em banho (19, 25 e 34 minutos). Os experimentos foram conduzidos com extrato enzimático bruto obtido utilizando o fungo *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, tendo como substrato o subproduto do processamento de óleo de canola, em condições de fermentação, extração e meio reacional otimizadas em estudos anteriores. Para avaliação do efeito das variáveis sobre a atividade enzimática, utilizou-se a técnica de planejamento experimental. Através do qual foi possível verificar a influência da temperatura e do tempo de exposição na atividade enzimática, sendo as melhores condições alcançadas quando utilizou-se o ponto central do planejamento experimental que foi de temperatura de 45°C, tempo de exposição de 25 minutos e potência das ondas ultrassônicas de 50%, onde observou-se um incremento na atividade hidrolítica em torno 300%. Com isso pode-se concluir que a exposição das lipases microbianas a ondas ultrassônicas apresenta-se como um processo promissor na obtenção de incremento na atividade hidrolítica, trazendo ainda a possibilidade de outros estudos para avaliação da estabilidade da enzima após este tipo de tratamento.*

INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas facilmente obtidas a partir de microrganismos e de células de origem animal e vegetal, sendo um biocatalisador bastante versátil, que pode ser utilizado em biocatalise em meio orgânico e em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (Shang et al., 2015). As lipases tem apresentado algumas vantagens como a alta atividade, estabilidade, regioespecificidade e estereoseletividade, podendo ser usada em diversas aplicações dentro da indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e química fina (Shang et al., 2015).

Essas enzimas são capazes de atuar na ligação éster-caboxílica de triglicerídeos, sintetizando assim ácidos graxos e glicerol. Devido a sua especificidade estas enzimas são amplamente aplicadas em diversos processos que não somente os convencionais citados acima, como na produção de biodiesel, tratamento de efluentes com elevada carga lipolítica (Pastore; Costa; Koblitiz, 2003). Entretanto, sua obtenção comercial é de alto custo, e desse modo, uma alternativa além da otimização da produção da enzima via fermentação em estado sólido, é a busca soluções que promovam um incremento na atividade hidrolítica e a estabilidade destas enzimas, dentre elas estão exposição a radiações, o armazenamento em diferentes temperaturas, mudança de pH e o uso do ultrassom.

A utilização de enzimas em bioprocessos enzimáticos pode acarretar em redução no consumo de energia e água destinada ao processo, produção de efluentes com baixa toxicidade, no entanto este processos costumam apresentas taxas de reação baixas (Ramón et al., 2015), assim o uso de tecnologias que possam melhorar o desempenho enzimático são de extremo interesse.

O ultrassom vem se destacando nas últimas décadas como uma alternativa aos processos convencionais dentro da área biotecnológica (Souza et al., 2013), com diferentes finalidades, em sua maioria, sendo usado para o rompimento celular (Nunes et al., 2014), afim de melhorar o processo de extração enzimático ou no tratamento conjunto da enzima e substratos em reações enzimáticas como no trabalho de Liu et al. (2015).

A aplicação do ultrassom em reações enzimáticas pode ser dividida em dois grupos: o primeiro que utiliza o ultrassom como pré tratamento antes da reação enzimática, com o

objetivo de reduzir o tamanho das partículas e assim conseqüentemente aumentar a área de superfície catalítica, reduzindo possíveis problemas de transferência de massa. O segundo caso é a utilização do ultrassom na reação enzimática, neste caso a energia de cavitação acelera a velocidade da reação, portanto altera as constantes de reação, mas o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre não é claro, acreditasse que o aumento da circulação do líquido, aumente o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima (Delgado-Povedano e Luque de Castro, 2015).

A utilização do ultrassom como pré-tratamento propiciou melhoras significativas na constante cinética aparente de reação de produção do lipídeo 1,3 - dioleoyl-2-palmitoylglycerol a partir de tripalmitin e ácido oleico, mostrou o melhor desempenho da enzima e o aprimoramento da afinidade entre o substrato e enzima (Liu et al. 2015). Os resultados apresentados por Ramón et al (2015) demonstram o potencial de utilização do ultrassom em reações hidrolíticas enzimáticas, visto que houve um incremento de 32% na quantidade de açúcares fermentescíveis quando da utilização desta tecnologia associada a temperatura de tratamento.

A utilização do ultrassom pode reduzir problemas relativos a transferência de massa em sistemas enzimáticos, melhorar a estabilidade e atividade das enzimas. Estudos direcionados a utilização das amilases na conversão de resíduos agroindustriais ricos em amido, para a obtenção de açúcares para a produção de bioetanol, tem demonstrado o potencial de utilização desta tecnologia (Souza et al., 2013).

A ação do ultrassom sobre o comportamento enzimático é influenciada por algumas variáveis como a frequência utilizada, potência do equipamento, bem como a intensidade usada no tratamento. Entretanto, resultados experimentais demonstram grande variabilidade no comportamento da enzima quanto ao uso de frequência quando tratada com diferentes dispositivos de ultrassom (Delgado-Povedano e Luque de Castro, 2015) sugerindo assim a necessidade de pesquisas voltadas a elucidação da série de dúvidas relativas a aplicação desta ferramenta no que concerne principalmente esta variável.

Alguns estudos tem mostrado a versatilidade desta ferramenta, sendo que as ondas ultrassônicas podem vir a resultar no incremento na atividade enzimática. Leaes (2012), mostrou que o uso do ultrassom, resultou em uma redução na energia de ativação na

reação hidrolítica de amido solúvel utilizando as enzimas glicoamilase e α -amilase, observou-se um aumento na energia cinética molecular, logo maior eficiência enzimática. Devido a estes resultados e a escassez de dados que relatem o uso do ultrassom na melhoria da atividade hidrolítica de lipases, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho do ultrassom na melhoria da atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando como substrato torta de canola.

MATERIAL E MÉTODOS ANALÍTICOS

Enzima Lipase

A lipase utilizada nos ensaios foi obtida após o processo de fermentação em estado sólido, tendo como substrato torta de canola e como microrganismo produtor o fungo *Aspergillus niger*, em condições controladas de temperatura (27°C), umidade (60% m/m) e nitrogênio (2% m/m) em 48 horas de fermentação. A enzima utilizada foi extraída do meio fermentado utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0. Onde após o período de fermentação, o meio foi macerado retirando-se duas frações do meio fermentado para determinação do pH e umidade da amostra (1g e 0,5g), respectivamente. O restante do meio foi pesado e transferido para um erlenmeyer (250mL) e adicionado 45mL de tampão fosfato de sódio realizando assim, a extração da enzima em agitador orbital com velocidade de 150 rpm a uma temperatura de 50°C por 30 minutos. O sobrenadante foi obtido através de prensagem manual com o auxílio de um filtro de nylon, sendo este utilizado para dosagem lipásica (Venturin et al, 2013). Para os experimentos a enzima foi utilizada na forma de extrato bruto.

Tratamento da enzima por ondas ultrassônicas

O extrato enzimático bruto foi avaliado em banho de ultrassom em diferentes condições de temperatura, potência de ultrassom e tempo de exposição, conforme definição em planejamento experimental. O equipamento utilizado foi a Lavadora Ultra-Sonica UNIQUE, modelo USC-1800 A, frequência US 40KHz e potência máxima de 137W (0,42 W/cm²). Alíquotas de 10 ml do extrato enzimático bruto foram colocadas em béqueres de 25 ml e então submetidas ao banho de ultrassom, variando-se as condições conforme planejamento experimental. Para realização dos experimentos de tratamento a enzima, foi elaborado um planejamento experimental do tipo DCC (Delineamento Composto Central) onde o efeito da radiação de ultrassom em banho térmico teve como

condições das variáveis testadas a temperatura do banho térmico (30, 39, 45, 54 e 60 °C), a potência do ultrassom regulada em percentuais da potência máxima, sendo os valores testados (0, 39.6, 66, 105.6 e 132 watts) e o tempo de exposição em banho (10, 19, 25, 34 e 40 minutos). Após a exposição foi determinada a atividade hidrolítica das amostras em triplicata, em paralelo realizou-se o branco reacional, o qual continha extrato enzimático sem tratamento. Na condição de maior incremento na atividade enzimática obtida no planejamento experimental foi realizado um ensaio com o extrato enzimático concentrado.

Determinação da Atividade Hidrolítica

A determinação da capacidade de hidrólise da enzima lipase foi realizada utilizando uma emulsão de óleo de oliva 10% (m/v) e goma arábica 5% (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6. Foram utilizados 18 mL de emulsão e 2 mL da amostra do extrato bruto tratado. Após incubação com agitação, por 30 minutos e temperatura de 35°C, a reação foi interrompida através da adição de solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados até pH 11,00 com solução 0,05 M de NaOH. Sendo que uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme descrito anteriormente o tratamento com ultrassom foi efetuado utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR). A Tabela 1 abaixo apresenta os resultados dos ensaios realizados utilizando o extrato enzimático bruto em diferentes condições de temperatura, tempo de exposição e potência das ondas ultrassônicas.

A Atividade relativa calculada para os experimentos, foi definida como sendo o valor absoluto ou seja: (atividade final após o tratamento/ atividade inicial) x 100.

Através da análise da Tabela 1 pode-se constatar que o ponto central do planejamento foi a condição que apresentou maior incremento de atividade, com valores que em média apresentaram-se 319% maiores que a atividade do extrato bruto antes do tratamento. As maiores atividades relativas foram obtidas nos ponto central onde utilizou-se a temperatura de 45°C, tempo de exposição de 25 minutos e potência de

66W ou seja 50% da potência máxima que pode ser fornecida pelo equipamento. Observou-se que a temperaturas e o tempo de exposição da enzima quando trabalhados em condições de extremos menores e maiores não apresentaram incremento na atividade hidrolítica, ao contrário levaram a redução da mesma.

Trabalhos relatam o uso da tecnologia de ultrassom associada ou não a temperatura na inativação de enzimas como a polifenoloxidase, responsável pelo escurecimento de frutas, mostrando que o ultrassom é eficiente na inativação desta enzima mesmo em baixas temperaturas (Sulaiman et al, 2015). Outros trabalhos trazem que este comportamento apresentado pela enzima no nível superior de temperatura e potência pode estar relacionado ao efeito sinérgico da temperatura e as ondas ultrassônicas, efeito este já relatado por Wang (2011), que descreve a possibilidade de ocorrer a desnaturação da enzima, devido ao fato de que a sonificação do líquido resultar em um aumento na temperatura, bem como estimular o processo de cavitação. No entanto, ainda existem muitas dúvidas para serem elucidadas quanto ao efeito do ultrassom no tratamento de enzimas, visto que, o trabalho desenvolvido por Laes (2013) relata o efeito positivo com o aumento da temperatura quando aplicadas a enzimas amilolíticas.

No presente estudo verificou-se que valores elevados de temperatura, potência do ultrassom e tempo de exposição resultaram em inativação parcial ou total das lipases.

Atividade Relativa

$$\begin{aligned}
 &= 314,73 + 9,49 * \text{Tempo} - 89,81 * \text{Tempo}^2 + 1,14 * \text{Temperatura} \\
 &- 80,46 * \text{Temperatura}^2 - 6,67 * \text{Potência}^2 + 26,54 * \text{Tempo} \\
 &* \text{Temperatura} - 51,54 * \text{Tempo} * \text{Potência} - 9,41 \text{Temperatura} \\
 &* \text{Potência}
 \end{aligned}$$

(Eq. 2)

Após análise da Tabela 2, verifica-se que o modelo é válido com 95% de confiança, visto que o F calculado é superior ao F tabelado e o coeficiente de determinação obtido foi de 86%. Através da validação do modelo pode-se confirmar as melhores condições para a utilização do ultrassom no tratamento da enzima lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando a torta de canola como substrato.

Pode-se constatar que valores de tempo, temperatura e potência de ultrassom utilizados na região em torno do ponto central produzem os melhores resultados de ativação das lipases produzidas pelo microrganismo.

A irradiação por ultrassom é um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima (Lin e Liu, 1995; Khan, Jadhav e Rathod, 2015; Ramón et al, 2015), assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional. Porém as suas frequências de irradiação podem promover a formação de radicais livres que alteram células e enzimas presentes no meio. No caso de proteínas globulares, frequências entre 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar a hidrólise. Já para proteínas lineares essa absorção depende do conteúdo de α -hélice. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas. Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos de tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase.

Estudos comparativos de hidrólise, catalisada por lipase, em óleo de soja em um sistema isento de solvente foram efetuadas por Liu et al, (2008). Os autores constataram que uma potência de ultrassom de 1,64 W/mL produziu efeito satisfatório na hidrólise, aumentando a taxa global de hidrólise enzimática em mais de duas vezes quando comparada a reação sem ultrassom.

Convém salientar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresenta o uso do ultrassom já na reação catalisada pela enzima, pode-se citar os trabalhos realizados por Ceni et al, (2011), Fiametti et al, (2011), Lerin et al, (2011), Khan, Jadhav e Rathod (2015) e Ramón et al, (2015). O mecanismo de ação do ultrassom sobre lipases utilizadas na síntese de cetil oleato, demonstrou que pode ocorrer a indução da cavitação, processo de formação e aumento na colisão de cavidades ou bolhas, que afetam as regiões próximas, aumentando a temperatura e pressão resultando na melhora da difusão do ácido oleico ao acesso a enzimas, influenciando assim na taxa de reação de síntese oleato de cetil (Khan, Jadhav e Rathod 2015). Nestes casos, o objetivo do uso

seria diminuir o tempo reacional, efeito que foi conseguido com o uso do ultrassom e em alguns casos até aumento dos rendimentos reacionais. Embora os resultados apresentados pelos autores não possam ser diretamente comparados com os deste trabalho, fica evidente o potencial de aplicação da radiação ultrassônica.

Pelos resultados apresentados no planejamento de experimentos realizado, fica claro que a exposição ao ultrassom, além de reduzir o tempo de reação, também está aumentando a atividade enzimática, provavelmente pela alteração conformacional da estrutura proteica, o que também poderá contribuir na redução do tempo reacional quando esta enzima é aplicada.

Trabalhos recentes como o de Laes et al (2013) utilizando ondas ultrassônicas para avaliar o desempenho enzimático de amilases e α -amilases, demonstram que o ultrassom afeta o comportamento destas enzimas. Sendo que as mesmas respondem de forma diferente para as variáveis independentes (temperatura e pH), verificou-se que no caso das enzimas citadas acima houve um aumento na atividade enzimática para a faixa de temperatura até 50°C em presença de ultrassom, quanto a energia de ativação destas enzimas em presença do ultrassom foi considerada reduzida, possibilitando a hidrólise do amido em temperaturas mais baixas como a 30°C (Laes et al., 2013).

No caso das lipases não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse o efeito do ultrassom sobre a enzima individualmente com o objetivo de melhorar a sua atividade, foram encontrados apenas trabalhos que relatam o uso de ultrassom no tratamento conjunto da enzima e substrato durante a reação enzimática com a finalidade de melhorar seu desempenho, como é o caso do trabalho apresentado por Liu et al (2015).

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos experimentalmente pode-se observar modificações no comportamento da enzima lipase quanto a sua atividade hidrolítica, visto que, se obteve um incremento de aproximadamente 300 % na atividade enzimática relativa, se comparado a atividade da enzima sem o tratamento com o ultrassom. Também foi possível verificar a influência da temperatura e do tempo de exposição na atividade enzimática, sendo as melhores condições alcançadas quando utilizou-se o ponto central do planejamento experimental que foi de temperatura de 45°C, tempo de exposição de 25 minutos e potência das ondas ultrassônicas de 50%. Neste estudo foi possível

verificar que utilizando está enzima na condição de maior potência do ultrassom, resultou em uma possível inativação enzimática. Desta forma conclui-se que o uso do ultrassom pode ser uma alternativa bastante promissora na busca de melhorias na atividade hidrolítica da enzima lipase, produzida pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando torta de canola como substrato.

REFERÊNCIAS

- CENI, G. et al. 2011. Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glyceryl benzoate in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. v.48, p.169-174.
- Delgado-Povedano, M. M., Luque de Castro, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta* - In Press, 2015.
- Fiametti, K. G., Sychoski, M. M., De Cesaro, A., Furigo JR, A., Bretanha, L.C., Pereira, C.M.P., Treichel, H., De Oliveira, D., Oliveira, J.V., 2011. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 18, p. 981-987.
- Khan, N. R., Jadhav, S. V., Rathod, V. K., 2015. Lipase catalyzed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: optimization and kinetic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 522-529.
- Laes, E. X. Efeito do ultra-som na atividade de enzimas amilolíticas e sobre a eficiência de hidrólise de amido de mandioca. Dissertação de mestrado, UFSM, 2012.
- Laes, E. X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A. P., Dal Prá, V., Bassaco, M. M., Terra, L. M., Mazutti, M. A., 2013. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 21-25.
- Lerin, L. A., Feiten, M. C., Richetti, A., Toniazzo, G., Treichel, H., Mazutti, M.A., Oliveira, J., Oestreicher, E. G., De Oliveira, D., 2011. Enzymatic synthesis of

- ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation. *Ultrasonics Sonochemistry*, p. 988-996.
- Lin, G. and Liu, H., 1995. Ultrasound-promoted lipase-catalysed reactions. *Tetrahedron Letters*, 36, 6067-6068.
- Liu, Y. X., Jin, Q. Z., Shan, L., Liu, Y.F., Shen, W., Wang, X. G., 2008. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrason Sonochem.* v.15, p. 402–407.
- Liu, S., Dong, X., Wei, F., Wang, X., Lv, X., Zhong J., Wu, L., Quek, S., Chen, H., 2015. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 100-108.
- Pastore, G. M., Costa, V. S. R., Koblitz, M. G. B., 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p. 135-140.
- Nunes, P. M. B., Martins, A. B., Brígida, A. I. S., Rocha-Leão, M. H. M., Amaral, P., 2014. Intracellular Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* Using Different Carbon Sources. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 421-426.
- Ramón, A. P., Taschetto, L., Lunelli, F., Mezdri, E. T., Souza, M., Foletto, E. L., Jahn, S. L., Kuhn, R. C., Mazutti, M. A., 2015. Ultrasound-assisted acid and enzymatic hydrolysis of yam (*Dioscorea sp.*) for the production of fermentable sugars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 98–102.
- Shah, S., Gupta, M. N., 2008. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chemistry Central Journal*, v.2.
- Shang, C. Y., Li, W.X., Jiang, F., Zhang, RF., 2015. Improved enzymatic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on ZnO nanowires/macroporous SiO₂ microwave absorbing supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113, 9–13.

- Souza, M., Mezdari, E. T., Zimmerman, E., Leaes, E. X., Bassaco, M. M., Dal Prá, V., Foletto, E., Cancellier, A., Terra, L. M., Jahn, S. L., Mazutti, M. A., 2013. Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted Irradiation. *Ultrason. Sonochem.*, 20, 89–94.
- Sulaimana, A., Sooa, M. J., Farida, M., Silva, F. V. M., 2015. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165, 133–140.
- Wang, J., Cao, Y., Baoguo, S., Wang, C., Mo, Y., 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic, *Ultrason. Sonochem.*, 18, 534–540.
- Venturin, B, Mulinari, J., Sbardelotto, M., Dall Agnol, A., Vargas, G. D. L. P., Treichel, H. Estudo da extração de lipase obtida por fermentação em estado sólido utilizando como substrato torta de canola. III SIMBBTEC. Londrina- PR, 2013.

Tabela 1: Matriz do DCCR realizado (valores codificados e reais) e valores de atividade relativa obtidos.

Ensaio	Tempo (min)		Temperatura (°C)		Potência (%)		Atividade Relativa (%)
	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	19	-1	39	-1	30	0
2	1	34	-1	39	-1	30	169
3	0	25	0	45	0	50	307
3	0	25	0	45	0	50	306
3	0	25	0	45	0	50	344
4	-1	19	-1	39	1	80	161
5	1	34	-1	39	1	80	0
6	-1	19	1	54	-1	30	0
7	1	34	1	54	-1	30	152
8	-1	19	1	54	1	80	0
9	1	34	1	54	1	80	69
10	0	25	-1,68	30	0	50	17
11	-1,68	10	0	45	0	50	55
12	1,68	40	0	45	0	50	0
13	0	25	0	45	-1,68	0	0
14	0	25	1,68	60	0	50	91
15	0	25	0	45	1,68	100	0

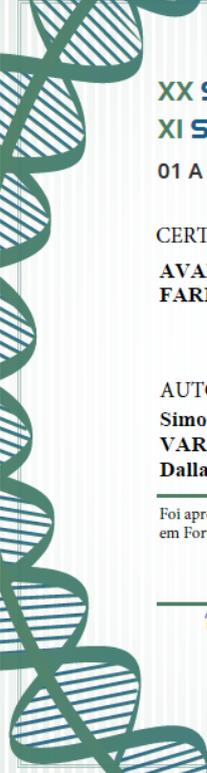
Tabela 2. Análise de Variância aplicada ao modelo

Causa de variação	SQ	GL	QM	Fcalc
Regressão	204240,9	9	22693,4	5,1
Resíduo	31224,1	7	4460,5	
Falta de ajuste	30279,0	5		
Erro Puro	945,2	2		
Total	235465,1	16		

F tabelado 95%; 9;7=3,67

R²=0,86

TRABALHOS SUBMETIDOS A EVENTOS





XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

01 A 04 DE SETEMBRO DE 2015 - FORTALEZA - CE - BRASIL

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASES EXTRAÍDAS DE FARELO DE ARROZ E FARELO DE SOJA EM ULTRASSOM

AUTORIA DE

Simone Maria Golunski, Jaqueline Buffon, Helen Treichel, GEAN DELISE LEAL PASQUALI VARGAS, Aline Frumi Camargo, Marina Sbardelotto, Bruno Venturin, Analise Dall Agnol, Camila Dalla Rosa, Daiane Paula Baldissarelli, Camila Torbes, Altemir Mossi

Foi apresentado na forma de Pôster no XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, realizado em Fortaleza, CE, Brasil, de 01 a 04 de setembro de 2015.



Luciana Rocha Barros Gonçalves
Presidente do Comitê Científico



Sueli Rodrigues
Presidente do XX SINAFERM / XI SHEB



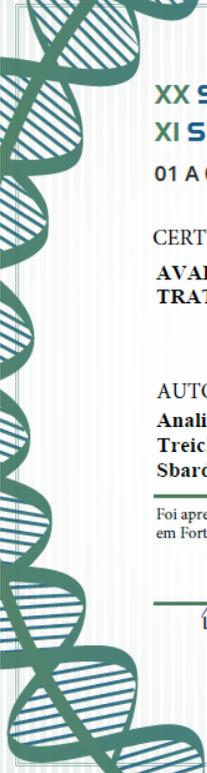
ABEQ Associação Brasileira de Engenharia Química







3c0b80be2127bd88be06a1e5e8749857





XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

01 A 04 DE SETEMBRO DE 2015 - FORTALEZA - CE - BRASIL

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASES COMERCIAL E NÃO COMERCIAIS TRATADAS EM MICRO-ONDAS

AUTORIA DE

Analise Dall Agnol, Daiane Paula Baldissarelli, Altemir José Mossi, Jaqueline Garda-Buffon, Helen Treichel, GEAN DELISE LEAL PASQUALI VARGAS, Simone Maria Golunski, Marina Sbardelotto, Aline Frumi Camargo, Camila Dalla Rosa, Bruno Venturin, Jéssica Mulinari

Foi apresentado na forma de Pôster no XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, realizado em Fortaleza, CE, Brasil, de 01 a 04 de setembro de 2015.



Luciana Rocha Barros Gonçalves
Presidente do Comitê Científico



Sueli Rodrigues
Presidente do XX SINAFERM / XI SHEB



ABEQ Associação Brasileira de Engenharia Química







12c12e8a06ed2bb19f82fa250596c819



XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS
 01 A 04 DE SETEMBRO DE 2015 - FORTALEZA - CE - BRASIL



CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO
EFEITO DO ULTRASSOM NA ATIVIDADE DA ENZIMA LIPASE OBTIDA A PARTIR DO FUNGO ASPERGILLUS NIGER

AUTORIA DE
GEAN DELISE LEAL PASQUALI VARGAS, Simone Maria Golunski, Marina Sbardelotto, Aline Frumi Camargo, Camila Dalla Rosa, Bruno Venturin, Analise Dall Agnol, Daiane Paula Baldissarelli, Camila Torbes, Altemir José Mossi, Helen Treichel

Foi apresentado na forma de Pôster no XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, realizado em Fortaleza, CE, Brasil, de 01 a 04 de setembro de 2015.



Luciana Rocha Barros Gonçalves
Presidente do Comitê Científico



Sueli Rodrigues
Presidente do XX SINAFERM / XI SHEB








a50e0d0c0cddb094e80412d0eb8803cb