

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA LIPASE DE MORINGA OLEIFERA

Lucas de Souza Borban (PIBIC/CNPq), Larissa Dorta de Oliveira (PIBIC/CNPq), Marcelo Fernandes Vieira (Co-orientador), Angélica Marquetotti Salcedo Vieira (Orientador), e-mail: amsvieira@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Maringá, PR.

Engenharia Química / Processos Industriais de Engenharia Química

Palavras-chave: Moringa Oleífera, Caracterização, Lipase

Resumo: *Moringa oleifera* é uma planta pertencente à família Moringaceae, nativa da Índia. A composição rica em proteínas faz com que a mesma se torne uma potencial fonte para obtenção de enzimas, tais como as lipases. Desta forma o objetivo deste trabalho foi verificar se as sementes de *Moringa oleifera* apresentam como uma potencial fonte de enzimas lipases. A atividade hidrolítica do extrato bruto enzimático foi determinada através do método titulométrico utilizando azeite de oliva como substrato. Como resultados teve-se que a *Moringa* apresentou uma atividade enzimática no extrato bruto de *Moringa*, sendo aproximadamente 20X inferior a atividade da enzima comercial, mostrando uma maior atividade lipolítica em caráter ácido.

Introdução

Lipases (glicerol éster hidrolases) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de óleos e gorduras com diferentes especificidades e podem, em meio orgânico, catalisar uma variedade de reações, como esterificação, interesterificação, transesterificação e aminólise. Essas enzimas encontram-se distribuídas na natureza em tecidos animais e vegetais e em biomassa microbiana.

As lipases vegetais apresentam certas vantagens com relação as lipases microbianas e animais, dentre essas vantagens temos a ampla disponibilidade, baixo custo e elevada especificidade. Tem-se que a aplicação de extratos brutos de lipases vegetais é economicamente viável, uma vez que não se utiliza processos custoso de purificação e imobilização (Santos et al., 2013), visto que as moléculas de enzima são naturalmente imobilizadas em materiais sólidos oriundos das sementes, possibilitando uma fácil recuperação do biocatalisador após bateladas sequenciais.

A *Moringa oleifera* (moringa) é a espécie indiana, mais conhecida da família Moringaceae, encontrada na maioria dos países tropicais, tais como Ásia, América do Sul e África (Alves et al., 2010). Tem-se estudado muito sobre a semente da moringa, uma vez que apresenta grande potencial

coagulante no tratamento de águas e biossorvente na remoção de contaminantes, mas possui pouco estudo sobre a utilização dessas sementes como fonte enzimática. Segundo Ruttarattanamongkol et al. (2014), uma composição aproximadamente (base seca) de 38,36% de proteína, 36,95% de gordura, 15,20% de carboidratos, 7,71% de fibra dietética, 5,88% de umidade e 3,61% de cinzas. Assim, a sua composição em lipídeos e proteínas faz com que esta semente seja uma possível matéria-prima para a obtenção de enzimas, tais como lipases.

Materiais e métodos

No preparo do extrato bruto enzimático foi empregada a metodologia de Liaquat e Owusu Apenten (2000) adaptada. As sementes foram trituradas em solução tampão fosfato de sódio pH 7 100mM, mantidas a 25 °C e 250 rpm, por 30min. A razão volume de tampão (mL) / massa de semente (g) utilizada no presente estudo foi de 4,5 (v/m). Um ensaio com extração de 24h nos pH 4 e pH 7, também foi realizado.

O extrato bruto foi submetido à determinação da atividade da enzima lipase de acordo com metodologia descrita Freire et al. (1997), com alterações. Em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 9 mL de emulsão (5% de goma arábica e 5% de azeite de oliva) em tampão fosfato de sódio 100mM a pH 7,0. Esta mistura foi homogeneizada e nesse sistema acrescentado 1 mL do extrato bruto enzimático. A mistura foi mantida a 37 °C por 30 min sob agitação de 130 rpm. Após a reação foi interrompida pela adição de 10 mL da solução de etanol 95%-água 5% 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados titulados com uma solução de KOH 0,02 M previamente padronizada até o pH final 11,0. O branco foi preparado nas mesmas condições, colocando-se à água no lugar do extrato enzimático durante a reação. Variou-se o pH da solução em tampão acetato de sódio (pH 4) e tampão fosfato de sódio (pH 7) e assim verificou-se a atividade lipolítica.

Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto sob as condições citadas acima e calculada de acordo com a Eq. (1).

$$\text{Atividade Lipolítica} = \frac{(V_A - V_B) \times M \times 1000}{t \times E} \text{ Eq. (1)}$$

Em que: V_A , volume da solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B , volume da solução de KOH gasto na titulação do branco (mL); M , molaridade da solução de KOH; E , quantidade de extrato enzimático utilizado no ensaio (mL); t , tempo de reação (min).

Resultados e Discussão

Na determinação da atividade enzimática, obtemos os volumes gastos na titulação. Através destes, traçou-se um gráfico do volume (mL) pelo

tempo (min). Fazendo o ajuste linear dos dados, encontramos o volume por tempo e juntamente com a equação 01, obteve-se as atividades enzimáticas, que estão contidas na tabela 01:

Tabela 01: Atividade enzimática do extrato bruto da Moringa e lipase comercial.

Diluição	Extrato de Moringa Atividade (U/mL)	Lipase Comercial Atividade (U/mL)
Sem diluir	7,00	-
10x	22,86	-
50x	126,90	2507,60
100x	210,00	2847,80

Ao analisar a Tabela 1 pode-se verificar que a atividade enzimática aumentou com a crescente diluição.

Para compararmos a atividade enzimática do extrato bruto da Moringa, realizou-se a medida da atividade de uma lipase comercial nas mesmas condições. Comparando-se os resultados encontrados para enzima comercial e para o extrato bruto de Moringa, ambas na diluição de 50 e 100 vezes, pode-se verificar que o extrato de Moringa apresentou uma atividade enzimática muito inferior em comparação a atividade da enzima comercial. Porém, deve-se levar em consideração que foi utilizado um extrato bruto da semente de Moringa, sem qualquer etapa de purificação.

O resultado de ensaio com extração da enzima por 24 h (diluição de 4x) encontra-se apresentado na Tabela 2.

Tabela 02: Atividade enzimática em função do pH para 24h de extração.

pH de extração	Atividade (U/mL)
pH 4	5,91
pH 7	0,63

Observa-se que para o pH 4 a atividade obtida foi superior aquela obtida para extração em pH 7, demonstrando que a enzima tem caráter mais ácido. Em pH 7 pode ter ocorrido uma desnaturação da enzima devido ao tempo prolongado de extração, ou mesmo uma possível hidrólise da enzima devido a presença de outras proteínas em solução.

Conclusões

Por meio deste trabalho foi possível verificar a presença de atividade enzimática no extrato bruto de Moringa, sendo aproximadamente 20X inferior a atividade da enzima comercial. Apresentou maior atividade em pH 4, constatando que a enzima possui caráter mais ácido.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Engenharia Química e ao órgão financiador do projeto, CNPQ.

Referências

Alves, V. N.; Mosquettaa, R.; Coelho, N. M. M.; Bianchinb, J. N. Roux, K. C. DI P.; Martendal, E.; Carasek, E. Determination of cadmium in alcohol fuel using Moringa oleifera seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. *Talanta*, v. 80, p. 1133 – 1138, 2010.

Liaquat, M., Apenten, R.K.O., 2000. Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters Using Plant Seedling Lipases in Organic Media. *J. Food Sci.* 65, 295–299.

Ruttarattanamongkol, K.; Siebenhandl-Ehnb, S.; Schreiner, M.; Petraschb, A. M. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, physico-chemical properties and profile characterization of Moringaoleifera seed oil in comparison with conventional extraction methods. *Ind. Crop.Prod.*, v. 58, p. 68–77, 2014.

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R., Mendes, A.A., 2013. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Ind. Crops Prod.* 49, 462–470.