

ANÁLISE DA HIDRÓLISE LIPOLÍTICA UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS.

Fernanda Dell Antonio Facchini, Patrícia Peres Polizelli, Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez – Bioquímica - Departamento de Química e Ciências Ambientais - Departamento de Física – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas – Campus São José do Rio Preto.

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Estão entre as biomoléculas mais notáveis devido à sua extraordinária especificidade de ação, de modo que somente certos substratos sofrem sua ação e unicamente um tipo de reação ocorre, sem reações colaterais ou produtos derivados, além de sua enorme capacidade catalítica. Ainda que as enzimas sejam proteínas, sendo, portanto, moléculas relativamente frágeis, elas realizam ações catalíticas em soluções aquosas diluídas, nos pHs biológicos e a temperaturas moderadas, em contraste marcante com as condições relativamente extremas que são, muitas vezes, necessárias para acelerar as reações químicas em laboratórios, portanto são superiores aos catalisadores produzidos artificialmente pelo homem (Campbell, 2000).

As hidrolases são enzimas que promovem a clivagem de ligações covalentes mediante a participação de uma molécula de água. A hidrólise de ésteres é catalisada por um grupo de enzimas chamadas “esterases”, que são relacionadas com seus substratos típicos. Consideram-se hidrolases de éster-carboxila as enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos. Os triacilglicerídeos são hidrolisados por lipases, enquanto ésteres simples, como e etilbutirato, são cindidos mais facilmente por uma outra esterase, que possui uma distribuição muito diversa no tecido animal.

As lipases [EC 3.1.1.3] são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo-água. Essa reação é reversível e as enzimas também podem catalisar a síntese de ésteres e a transesterificação em condições de baixa atividade de água, sendo consideradas, atualmente, como uma ferramenta química devido à sua habilidade de catalisar vários tipos de reações sintéticas em meios não aquosos (Saxena *et al*, 2003).

Dentre as reações inclui-se a acidólise, a alcoólise, a aminólise, a esterificação e a inter-esterificação (Safari, 1994; Vulfson, 1994 *apud* Saxena *et al*, 2003). As lipases são também a escolha da biocatálise, pois apresentam quimio-, regio- e enantioseletividade, características estas que propiciam a produção de novas drogas e produtos agroquímicos e químicos (Gotor, 1999; Saxena, 1999; Shimada, 1999; Theil, 1995 *apud* Saxena *et al*, 2003).

A escolha da lipase usada em cada tipo de aplicação é baseada na sua seletividade aos substratos, bem como à estereoespecificidade, tão bem quanto à estabilidade à temperatura e ao pH (Saxena *et al*, 2003). Além disto, apresentam relevância médica, principalmente em relação à arteriosclerose e hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação, ácidos graxos livres e diacilgliceróis, têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (Farooqui, 1987 *apud* Koblitz *et al*, 2004). Ainda, a descoberta da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos acendeu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliadas às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (Koblitz *et al*, 2004).

A hidrólise de óleos e gorduras tem a finalidade de produzir ácidos graxos livres, di e monoacilgliceróis e glicerol. As lipases, em geral, têm um grande potencial em degradar óleos e gorduras sendo melhores em relação aos catalisadores produzidos em laboratório pelo homem devido ao fato de poderem reagir em condições brandas de temperatura e pH, além de produzirem produtos não tóxicos, de forma a minimizar a poluição ambiental por óleos e gorduras.

Mais de 95% dos óleos e gorduras são constituídos de triacilglicerídeos, que são ésteres formados de glicerol e três ácidos graxos. Os triacilglicerídeos são insolúveis em água, e à temperatura ambiente variam sua consistência de líquido a sólido. Além de triacilglicerídeos, gorduras e óleos contêm componentes menores como: mono e diglicerídeos (importantes como emulsificantes); ácidos graxos livres; tocoferóis (importante antioxidante); esteróis e vitaminas lipossolúveis. (Faria *et al*, 2002). A diferença de propriedades dos óleos é determinada pela composição dos ácidos graxos podendo ter cadeia carbônica grande ou pequena, e variar o número e a posição de possíveis insaturações e sua posição na glicerina. (O'Brien, 1998).

O desenvolvimento de tecnologias baseadas na ação das lipases é um segmento de rápido crescimento da indústria de biotecnologia (Liese *et al.*, 2000). As suas aplicações industriais têm sido uma força motriz importante para as pesquisas durante os últimos anos (Soberon-Chavez & Palmeros, 1994).

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante à preservação dos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constituem um ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade nacional no cenário mundial.

O objetivo do trabalho é determinar a melhor condição de hidrólise utilizando como substrato o óleo de soja em diferentes valores de pH e temperatura e a gordura de boi utilizando diferentes concentrações de extrato enzimático.

Após a extração, clarificação e concentração da amostra a hidrólise lipolítica foi realizada variando-se o tempo de exposição, o pH entre 3.0 e 10.0 e a temperatura entre 25° e 65°C. No ensaio para determinar qual é o melhor quadro de hidrólise foi empregado aproximadamente 50% de óleo de soja, 10,15% de Triton X-100, 0,002% de CaCl₂ (10mM), 33,3 de tampão e 9,8% de extrato enzimático bruto. A solução foi então encubada a 37°C durante 60 minutos. A atividade enzimática foi obtida pela titulação com KOH 50mM, usando como indicador fenolftaleína, o que permitiu também calcular a quantidade de ácidos graxos liberados, sendo para isto realizada uma curva padrão de ácido graxo (linoléico – presente em maior quantidade no óleo de soja pura) em função do volume de KOH utilizado.

O melhor resultado variando-se o tempo de exposição ao substrato foi encontrado um valor de 90 minutos, diminuindo sua atividade ao passar deste tempo. Para o pH, a faixa entre 8 e 8,5 foi a que resultou em um pH ótimo da lipase. Já atividade enzimática em relação à temperatura de 40°C foi a melhor obtida, o que confirma a temperatura ótima da enzima extraída da *Pachira aquática*, pois em ensaios enzimáticos realizados paralelamente utilizando p-nitrofenilpalmitato como substrato observou a mesma faixa de temperatura.

Nas condições ótimas de temperatura e pH estabelecidas foi analisada a hidrólise para diferentes tipos de óleos naturais como substrato. Foram empregados: o óleo de soja puro (virgem) e usado, óleo de oliva, óleo de algodão, óleo de canola, óleo de milho e óleo de girassol. Pelo fato de a lipase extraída de *Pachira aquatica* ter preferência por cadeias com menor número de insaturações, uma maior atividade é encontrada no óleo de soja usado. Isto pode ser atribuído ao fato de o óleo depois de usado diminuir a quantidade de insaturações e/ou conter insaturações trans não presentes anteriormente.

O óleo de oliva obteve a maior atividade dentre todos os óleos naturais puros, pois este contém maior número de ácido oléico em sua composição (80,3%) - o qual contém apenas uma insaturação entre os 18 carbonos. Observa-se ainda um decréscimo da atividade enzimática conforme a porcentagem de ácidos graxos de cadeia com duas insaturações aumenta, como por exemplo, no óleo de soja com 53,7% de ácido linoléico – contendo 2 insaturações ao longo dos 18 carbonos - e para os óleos de canola, algodão, milho e girassol.

Outro quadro de hidrólise utilizando gordura de boi foi realizado variando a concentração de 5 a 20µg/µL em pH de 8,5, durante períodos de 6 a 72 horas. A gordura de boi foi picada, processada em processador de alimentos e peneirada, de forma a obter a mesma massa aproximadamente, depois foram expostos a diferentes concentrações de extrato enzimático bruto e tampão Tris-HCl pH 8,5 30mM e, posteriormente, 100mM.

O melhor resultado foi a concentração de 15 a 20µg/µL, durante um período de 24 horas para o tampão 100mM, pois o tampão de concentração 30mM não foi suficiente para manter o pH, de forma a diminuir a atividade enzimática com o tempo.

Referências Bibliográficas

CAMPBELL, M. K., “Bioquímica”, 2000.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TTG/DTG e DTA. **Eclética Química**. v. 27, 2002.

FAROOQUI, A.A.; TAYLOR, W.A.; HORROCS, L.A. Phospholipases, Lysophospholipases and Lipases and Their Envolvement in Various Deseases. **Neurochemical Pathology**. v. 7, n. 2, p. 99-128, 1987.

GOTOR V. Non-conventional hydrolase chemistry ; amide and carbamate bond formation catalysed by lipases. **Bioog Med Chem**; 7, 2189-97,1999.

KOBLITZ, M.G.B.; PASTORE, G.M.; Partial purification of the lipase from *Rhizopus sp* by two differenr cromatografhic methods; **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(2): 287-292, abr-jun 2004.

LIESE, A., SEELBACH, K., WANDREY, C. editors. **Industrial biotransformations** Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

O'BRIEN, RICHARD D.; Fats and Oils: Formulating and processing for applications, **Technomic Publishing Company**, Inc. Texas, 1998.

SAFARI , M.; KREMASHA S. Interesterification of butterfat by comercial microbial lípase in consurfactant-free microemulsion system. **J Am Oil Chem Sov**, 71, 951-4, 1994.

SAXENA R.K.; GHOSH P.K.; GRUPTA R.; DABIDSON W.S.; BRADOO S.; GULATI R.; Microvial lípases: potential biocatalysts for the future industry. **Curr Sci**; 77; 101-15,1999.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN A.; BHOOPANDER GIRI. Purification and caracterization of alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**. 2003.

SHIMADA Y.; HIROTA Y. ; BABA T. ; SUGHARA A. ; MORIYAMA S. ; TOMINAGA Y. ; TERAÍ T. Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids. **JAACS**. 76, 713-6,1999.

SOBERON-CHAVEZ, G., PALMEROS, B. Pseudomonas lipases: molecular genetics and potential industrial applications. **Crit Rev Microbiol.**, v. 20 (2), p. 95-105, 1994.

THEIL F., Lípase supported syntesis of biologically active compounds. **Chem Rev** ; 95 ; 2203-27, 1995.

VULFSON, E. N. Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application; **Woolley, P.; Petersen, S. B.**, eds.; Cambridge University Press: Great Britain, 1994, p. 271.

Auxílio financeiro: FAPESP 05/03157-1 (FDAF), FAPESP 05/02418-6 e CNPq (GOBR).