

# Estudo da atividade enzimática de lipases presentes no mesocarpo de dendê (*Elaeis guineensis*)

Jéssica Kele Arruda Macêdo<sup>1</sup>, Dasciana de Sousa Rodrigues<sup>2</sup>, Thályta Fraga Pacheco<sup>3</sup>, Thaís Demarchi Mendes<sup>4</sup>, Cibele Favoreto<sup>5</sup>, Félix Gonçalves de Siqueira<sup>6</sup>, Patricia Verardi Abdelnur<sup>7</sup>

## Resumo

A acidificação do óleo de dendê decorrente da atividade de lipases é um obstáculo em sua produção e tem um forte impacto sobre sua qualidade, podendo levá-lo a se tornar impróprio para consumo humano. Assim, existe um grande interesse na identificação das alterações que ocorrem no óleo durante a maturação e após a colheita dos frutos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de isolamento das lipases responsáveis pela acidificação do óleo e verificar sua atividade por meio de técnicas bioquímicas e analíticas.

O mesocarpo dos frutos de dendê foram picados, triturados em uma solução aquosa e centrifugados para determinação das atividades de lipases por meio de titulação utilizando hidróxido de sódio. Além disso, a formação de produtos da degradação enzimática de triacilgliceróis também foi avaliada por espectrometria de massas (MS).

Os resultados obtidos indicam a presença de lipases em uma das fases obtidas, uma vez que a titulação mostrou uma rápida acidificação do óleo na presença do extrato enzimático e a análise por MS indicou a presença de novos compostos com massas moleculares menores, além da diminuição na intensidade dos compostos de alta massa molecular após 15 minutos de reação.

O protocolo de isolamento da lipase utilizado apresenta resultados satisfatórios, visto que a atividade de lipase foi identificada em frutos de *Elaeis*

<sup>1</sup> Bióloga, doutora em Biologia molecular, pós-doutoranda na Embrapa Agroenergia, jessica.macedo@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

<sup>5</sup> Química, mestranda em bioenergia e bioprocessos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, cibele.favoreto@hotmail.com

<sup>6</sup> Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

<sup>7</sup> Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

*guineensis* coletados na Embrapa Cerrados. No entanto, a identificação dos compostos químicos encontrados ainda é indispensável a fim de confirmar o aumento de ácidos graxos e diminuição de acilgliceróis, como mono, di e triacilgliceróis. Além disso, outras condições para as reações enzimáticas como variação de temperatura e pH deverão ser testadas a fim de compreender melhor a ação dessas enzimas.

## Introdução

### Dendê

O óleo de dendê ou palma, extraído de *Elaeis guineensis*, compreende a maior fonte de óleo vegetal, correspondendo a cerca de 32% do mercado mundial. Espera-se ainda que a produção de óleo de palma do mercado deverá aumentar para atender à demanda, que está prevista para dobrar até 2030 (CARLSSON et al., 2011). Uma questão importante na produção do óleo é a acidificação rápida que pode ocorrer após a colheita. Isso ocorre em decorrência da atividade de lipases que liberam ácidos graxos livres (FFA – *free fatty acid*) no mesocarpo de frutos maduros (EBONGUE et al., 2006). Essa acidez tem um forte impacto sobre a qualidade do óleo, já que um teor de FFA de 45% é considerado impróprio para o consumo humano (EBONGUE et al., 2008). Como essa acidificação ocorre rapidamente após a colheita, as indústrias devem processar os cachos em até 2 dias, impossibilitando a estocagem e, conseqüentemente, dificultando a exploração do óleo de palma em grande escala. Apesar de a lipase poder ser inativada por tratamento térmico dos cachos colhidos, qualquer ação enzimática antes do tratamento térmico leva à liberação de FFAs que devem ser removidos por meio de um processo de refinação onerosa e que leva a perdas de óleo (GIBON et al., 2007).

A importância econômica da acidez do óleo de palma faz com que a lipase do mesocarpo seja uma enzima de grande interesse em dendê (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000). Sabe-se que essas plantas podem apresentar uma atividade lipolítica alta ou baixa e que essa característica é monogênica (EBONGUE et al., 2008). Diversos trabalhos buscando lipases que poderiam estar envolvidas com a acidez do óleo foram realizados (BOURGIS et al., 2011; EBONGUE et al., 2008; MORCILLO et al., 2013; EBONGUE et al., 2006). No entanto, a atividade das lipases presentes nesses frutos ainda não foi completamente elucidada. Assim, a ação dessa classe

de enzimas após a colheita dos frutos ainda precisa ser estudada, já que estas contribuem não apenas para a alteração do perfil lipídico dos frutos, mas também para o processo de acidificação do óleo, gerando grandes impactos econômicos e sociais. Além de desenvolver um protocolo de isolamento das lipases responsáveis pela acidificação do óleo, este trabalho tem como objetivo verificar sua atividade por meio de técnicas bioquímicas e analíticas.

## Materiais e métodos

### Produção do extrato bruto

A purificação da lipase foi realizada de acordo com o método descrito por Abigor e colaboradores (1985). O extrato foi preparado pela homogeneização do mesocarpo com tampão fosfato 0,1 mol/L contendo EDTA 0,1 mol/L. O material foi filtrado com uma gaze e centrifugado a 1.1000 x g durante 30 minutos. Três frações foram obtidas: uma camada superior de gordura, uma camada intermediária aquosa e detritos sedimentados. A camada superior foi transferida para um tubo contendo solução aquosa de éter dietílico saturada em cloreto de sódio. Essa mistura foi suavemente agitada e mantida em repouso a 4 °C durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm dando origem a três fases: uma fase superior contendo éter e lipídeos, uma camada intermediária contendo a enzima e uma camada inferior contendo outros componentes solúveis em sal. Ambas as fases superior e inferior foram removidas com uma pipeta Pasteur e a camada sólida (intermediária, contendo a enzima) foi reextraída duas vezes com éter e NaCl saturado para remover a máxima quantidade de óleo possível da fase contendo a enzima. Esse extrato bruto da enzima foi dialisado contra água destilada durante 24 horas.

### Atividade lipolítica

Para determinação da atividade de lipase, foram usadas como substrato duas emulsões preparadas pela mistura de 0,75 g do óleo de dendê refinado, 30 mL de tampão fosfato 10 mmol/L (pH 7 ou 9) e 6 g de goma arábica. A liberação de ácidos graxos após adição de 1 mL do extrato bruto obtido da fração do mesocarpo de dendê foi monitorada em diferentes intervalos de tempo, de 150 até 1.000 segundos, e o pH mantido em 7 ou 9, com o auxílio de um titulador automático. A atividade enzimática é diretamente proporcional à quantidade de

hidróxido de sódio (100 mmol/L) necessária para neutralizar os ácidos graxos liberados e, neste trabalho, considerou-se uma unidade arbitrária de atividade como sendo volume de NaOH, 100 mmol/L por minuto, por mL de extrato enzimático. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética a 37 °C e a reação foi monitorada por até 1.000 segundos.

### Análise por espectrometria de massas

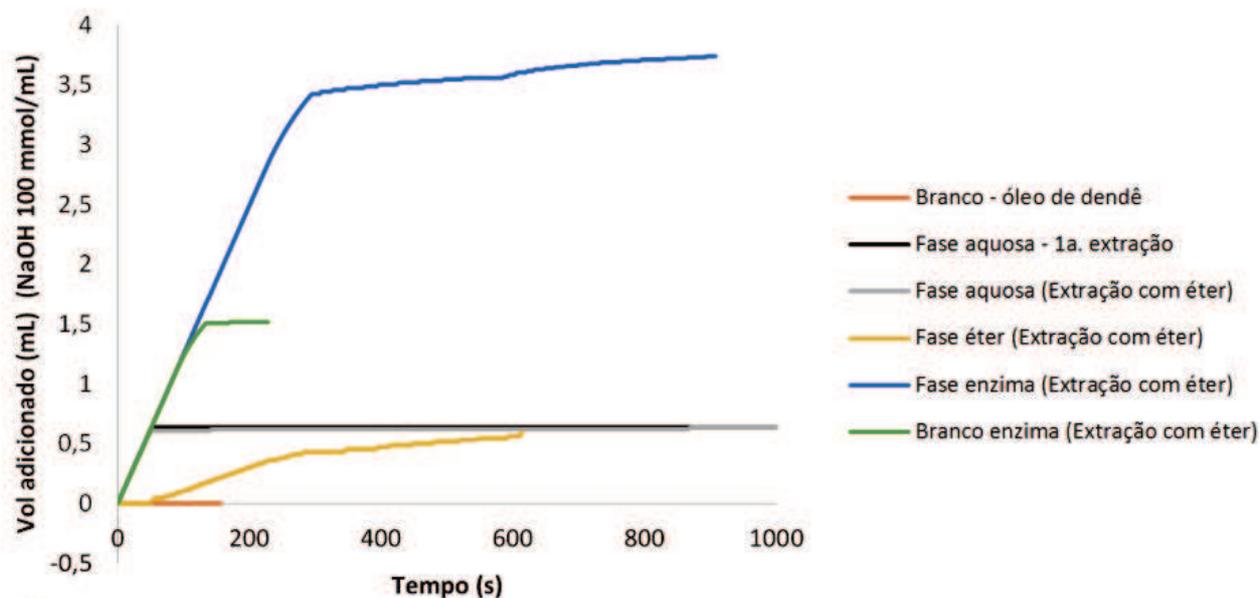
Para confirmar a acidificação do óleo, as seguintes amostras foram analisadas: o óleo (refinado fornecido pela Denpasa), o extrato bruto de mesocarpo de dendê, o hidrolisado proveniente da atividade lipolítica em pH 7 e um outro hidrolisado em pH 9, ambos obtidos no processo descrito no item “Produção do extrato bruto”.

As amostras (100µL) foram diluídas em 900 µL de metanol/tolueno (1:1) contendo ácido fórmico 0,1%. Em seguida, os tubos foram agitados e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Foram diluídos novamente 100 µL dessas soluções em 900 µL de metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. As análises foram realizadas por injeção direta (DIMS - *Direct Infusion Mass Spectrometry*) em um espectrômetro de massas Ion Trap (LTQ XL, *Thermo Fisher Scientific*). As condições de análise consistiram em um fluxo da seringa de 5 µL/min, temperatura do capilar de 400 °C, e os dados foram adquiridos utilizando fonte de ionização *electrospray* em modo positivo ESI(+)-MS com faixa de massa entre 100 *m/z* a 1.000 *m/z*. As análises foram realizadas utilizando os softwares LTQ 2.2 e Xcalibur 2.2 (*Thermo Scientific*) e os resultados avaliados pelo Xcalibur Qual Browser (*Thermo Scientific*).

### Resultados e discussão

No ensaio de atividade de lipase utilizando o extrato bruto obtido a partir do mesocarpo de frutos de *Elaeis guineensis* e óleo de dendê refinado como substrato, foi possível observar uma acidificação do meio na reação contendo a fase enzima da extração com éter e na reação contendo a fase éter (Figura 1, linhas azul e roxa, respectivamente), após 300 segundos, (após o titulador reajustar o pH do meio, o qual diminuiu drasticamente quando da adição do extrato enzimático em decorrência da presença de ácidos graxos nesse extrato). Isso indica a presença da enzima ativa nessa amostra. Tal atividade foi registrada

por um longo período de tempo (900 s). O branco contendo apenas a enzima (ausência de substrato, linha laranja) também apresentou uma acidificação rápida (queda inicial do pH devido a ácido preexistente no extrato enzimático), porém apenas em um primeiro momento (aproximadamente 100 s), seguido por estabilização da acidificação. As outras amostras também apresentaram acidificação nos primeiros segundos, seguido por estabilização do pH ao longo do tempo.

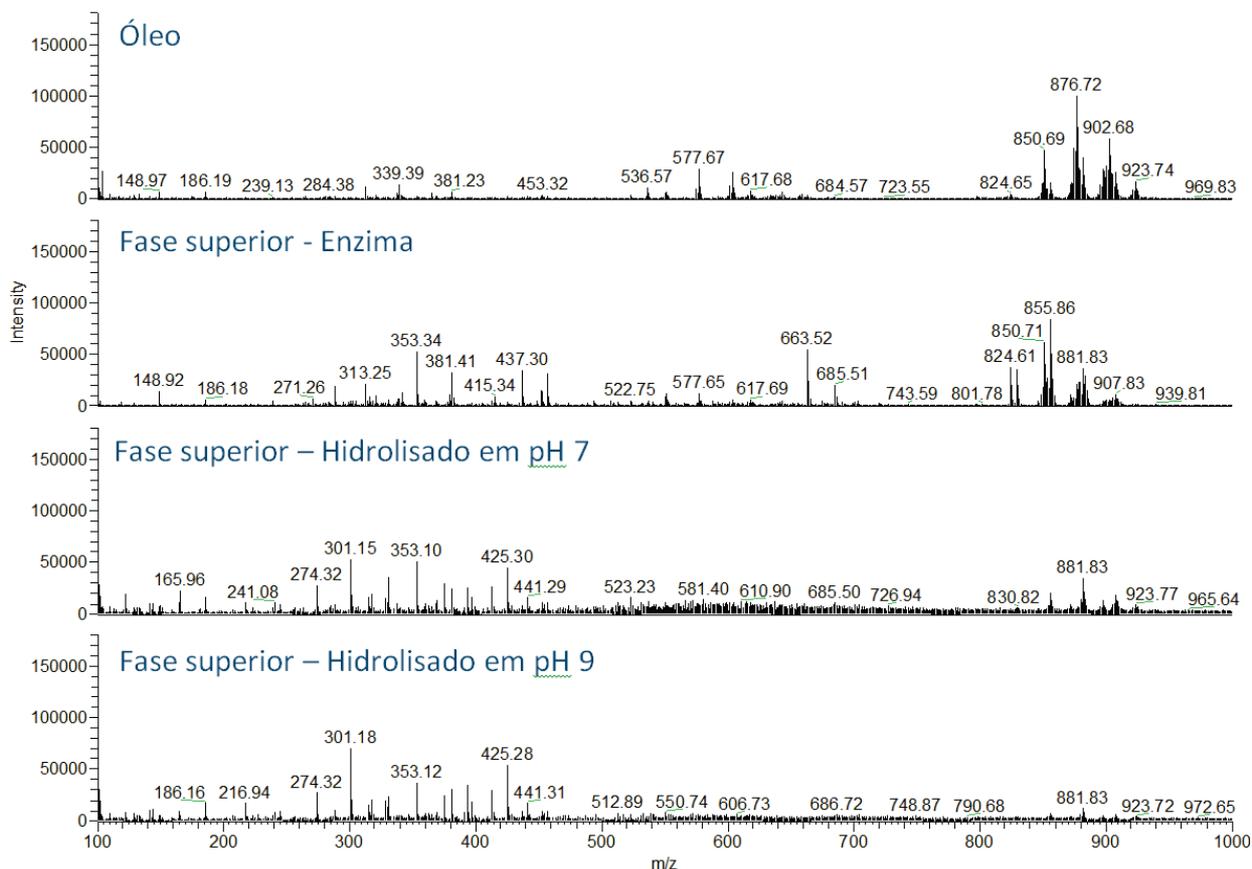


**Figura 1.** Perfil de hidrólise do óleo de dendê refinado catalisada por lipase de mesocarpo de dendê, utilizando titulador automático. A mistura foi mantida a pH 7 °C e 37 °C. Atividades calculadas após reajuste inicial do pH (mL de NaOH/min): Branco da enzima, 0; Fase enzima 0,03; Fase éter, 0,03; Fase aquosa (extração com éter), 0; fase aquosa (1ª extração), 0; Branco do óleo, 0.

Outra maneira de confirmar a atividade enzimática nas amostras foi por meio da análise de formação de produtos no óleo por espectrometria de massas. Após a diluição das amostras na solução de tolueno/metanol/ácido fórmico e centrifugação, houve a separação das amostras em duas fases, sendo uma superior e outra inferior. Dessa forma, na etapa seguinte de diluição, tanto a fase superior quanto a inferior de cada amostra foram diluídas em metanol/ácido fórmico e analisadas separadamente. A análise preliminar dos compostos da fase superior mostra a presença de uma ampla diversidade de componentes com  $m/z$  entre 100 e 1.000.

A comparação entre o substrato puro e as reações mostra que existe uma diminuição na intensidade dos compostos de alta massa molecular e aumento da

intensidade dos componentes de baixa massa (Figura 2). Isso pode indicar a presença de atividade enzimática, já que as lipases são enzimas que atuam de maneira específica sobre lipídeos e agem principalmente catalisando reações de hidrólise de triacilglicerídeos.



**Figura 2.** Identificação de compostos presentes no substrato, extrato enzimático e formação de produtos após a reação enzimática. Espectros de massas (ESI (+)-MS) das amostras: a) Óleo, b) Fase superior – Enzima, c) Fase superior – Hidrolisado em pH7, d) Fase superior – Hidrolisado em pH 9.

## Conclusão

O protocolo de isolamento da lipase foi desenvolvido e apresenta resultados satisfatórios, visto que uma atividade da lipase foi identificada no extrato enzimático de frutos de *Elaeis guineensis* coletados na Embrapa Cerrados. A identificação da atividade enzimática foi realizada por meio de titulação e por análise da formação de produtos por espectrometria de massas. No entanto, a identificação dos compostos formados será realizada utilizando experimentos de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*) e tandem (MS/MS) a fim de confirmar a identidade de cada íon.

## Apoio Financeiro

Finep.

## Referências

ABIGOR, D. R.; OPUTE, F. I.; OPOKU, A. R.; OSAGIE, A. U. Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 36, n. 7, p. 599–606, 1985.

BOURGIS, F.; KILARU, A.; CAO, X.; NGANDO-EBONGUE, G.; DRIRA, N.; OHLROGGE, J. B.; ARONDEL, V. Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 108, n. 44, p. 18186–18186, 2011.

CARLSSON, A. S.; YILMAZ, J. L.; GREEN, A. G.; STYMNE, S.; HOFVANDER, P. Replacing fossil oil with fresh oil—with what and for what? **European Journal of Lipid Science and Technology**, Malden, v. 113, n. 7, p. 812–831, 2011.

EBONGUE, G. F. N.; DHOUIB, R.; CARRIÈRE, F.; AMVAM ZOLLO, P.-H.; ARONDEL, V. Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 10, p. 611–617, 2006.

EBONGUE, G. F. N.; KOONA, P.; NOUY, B.; ZOK, S.; CARRIÈRE, F.; ZOLLO, P. H. A.; ARONDEL, V. Identification of oil palm breeding lines producing oils with low acid values. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 6, p. 505–509, 2008.

GIBON, V.; DE GREYT, W.; KELLENS, M. Palm oil refining. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 109, n. 4, p. 315–335, 2007.

MORCILLO, F.; CROS, D.; BILLOTTE, N.; NGANDO-EBONGUE, G.-F.; DOMONHÉDO, H.; PIZOT, M.; CUÉLLAR, T.; ESPÉOUT, S.; DHOUIB, R.; BOURGIS, F.; CLAVEROL, S.; TRANBARGER, T. J.; NOUY, B.; ARONDEL, V. Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 2160, 2013.

SAMBANTHAMURTHI, R., SUNDRAM, K., TAN, Y.-A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 507–558, 2000.