



PRISCILA BECKER SIQUEIRA

Caracterização bioquímica e compostos bioativos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Priscila Becker Siqueira**

**Caracterização bioquímica e compostos bioativos de  
macaúba (*Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.*)**

**Orientadora Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Priscila Becker Siqueira, e orientada pela Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo.

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Si75c Siqueira, Priscila Becker, 1975-  
Caracterização bioquímica e compostos bioativos de  
macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.) /  
Priscila Becker Siqueira . -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Macaúba. 2. *Acrocomia aculeata*. 3. Lipase .  
4. Capacidade antioxidante . 5. Compostos bioativos. I.  
Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biochemical characterization and bioactive compounds in  
macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.).

Palavras-chave em inglês:

Macaúba

*Acrocomia aculeata*

Lipase

Antioxidant capacity

Bioactive compounds

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Hélia Harumi Sato

Mário Roberto Maróstica Júnior

Eliana Setsuko Kamimura

Neuza Jorge

Data da defesa: 06-11-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo (Orientadora)

---

Profa. Dra. Helia Harumi Sato (Membro)

---

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior (Membro)

---

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura (Membro)

---

Profa. Dra. Neuza Jorge (Membro)

---

Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona (Suplente)

---

Profa. Glaucia Maria Pastore (Suplente)

---

Prof. Dr. Márcio de Barros (Suplente)



Aos meus pais e irmãos, que me mimaram, corrigiram e foram essenciais na formação do meu caráter;  
ao meu grande amor, Nielsen, com quem divido tudo o que sou;  
e sobretudo aos meus pequenos Frederico e Vítor, que são minha maior alegria,

dedico.



# Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu esposo, Nielsen, por estar sempre ao meu lado e por toda ajuda e estímulo no uso do L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.

À minha mãe, pela inestimável ajuda com as crianças.

À professora Gabriela Alves Macedo, pelo privilégio de tê-la como orientadora. Muito obrigada pela compreensão, confiança, apoio e por ter sido muito mais que uma orientadora durante todos esses anos.

Aos membros da banca examinadora por contribuírem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Marta Cristina Duarte e sua equipe, pelo auxílio nos testes microbiológicos.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA, por tornar cada dia de trabalho um dia especial. Agradeço a todos pelo companheirismo, pelo conhecimento compartilhado e por terem feito parte da minha vida.

Aos queridos Zé e Paulinha, pela ajuda na fase final da tese.

Às técnicas do laboratório de Bioquímica de alimentos e aos demais funcionários da FEA, pela ajuda e dedicação que me dispensaram.

Aos amigos, mais que queridos, com quem tive a oportunidade de conviver.  
Juliana, Márcio e Bia, obrigada por tudo!

À Unicamp, pela minha formação e por ter sido, muitas vezes, meu “lar”  
durante esta longa trajetória de estudos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

# Resumo

A palmeira macaúba, (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), é uma espécie nativa de florestas tropicais podendo ser encontrada em diversas regiões brasileiras, principalmente na região Centro-Oeste e Estado de Minas Gerais. Tem alto potencial para ser utilizada nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, além de ser usada para a produção de biocombustível. Há uma forte tendência do aumento no consumo de alimentos funcionais, e este fato tem despertado grande interesse da comunidade científica para o estudo de propriedades bioativas em plantas brasileiras, sobretudo nativas de grandes biomas nacionais, como a Amazônia e o Cerrado. Além disso, o aproveitamento integral e racional dos recursos agrícolas e extrativistas pode ser viabilizado e ampliado através do estudo nas áreas de biotecnologia e enzimologia. Polpa e amêndoa de macaúba foram investigadas com o objetivo de se determinar quais as principais enzimas presentes neste fruto e também avaliar algumas de suas propriedades bioativas. Há presença de enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase, e de outras enzimas, como celulase, pectinase e lipase na amêndoa e polpa do fruto. A presença de lipase na polpa de macaúba foi considerada expressiva e, desta forma, foi realizada sua caracterização. O extrato bruto de lipase apresentou atividade ótima em pH 5,5 e temperatura de 40 °C. Nestas condições sua atividade específica foi de 36 U/mg de proteína. Apresenta baixa estabilidade térmica, mas se mostrou estável em solventes orgânicos e possui maior afinidade por ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. Foram determinados o teor e a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e flavonoides, extraídos da polpa e amêndoa de macaúba, com diferentes solventes: água, etanol, metanol, acetona e acetato de etila. O extrato metanólico da polpa foi o que apresentou os melhores resultados. O teor de fenóis totais foi de 78 mg GAE/100 g e o de flavonoides de 68 mg CE/100 g, em base úmida. A polpa de macaúba apresentou capacidade an-

tioxidante intermediária, através das metodologias TEAC (9,6  $\mu\text{mol TE/g}$ ) e ORAC (36  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Os resultados obtidos permitiram o conhecimento de propriedades importantes de um fruto comum no território brasileiro, ainda pouco explorado comercialmente.

**Palavras chave:** macaúba, (*Acrocomia aculeata*), lipase, capacidade antioxidante, compostos bioativos.

# Abstract

The macaúba palm tree (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) is a native specie in tropical forests and can be found in some Brazilian regions, mainly in Mid-West and Minas Gerais State. It has great potential to be applied in food and cosmetic industries, moreover, it can be used in biodiesel. Nowadays, there is a great tendency in the consume of functional food, and it has called much attention of the scientific community to study the bioactive properties in Brazilian plants, specially the ones from great national biomas, such as Cerrado and Amazônia. The study of research areas, such as biotechnology and enzymology can also make feasible the rational use of agricultural resources. Pulp and kernel of macaúba were investigated in order to find the main enzyme present in this fruit as well analyze some of its bioactive properties. It was found oxidative enzymes, polyphenol oxidase and peroxidase, cellulase, pectinase and lipase in macaúba's kernel and pulp. The presence of lipase in the pulp was considered of relevant interest, thus its biochemical characterization was performed. Macaúba pulp crude extract showed optimum activity at pH 5.5 and temperature of 40 °C. Its specific activity was 36 U/mg of protein under the optimal conditions. This enzyme is not thermostable, but remains stable under organic solvent treatment and shows greater affinity to long chain fatty acid esters. Total phenolic compounds and flavonoids content were determined in pulp and kernel of macaúba using different solvent solutions, water, ethanol, methanol, acetone and ethyl acetate. The methanolic extraction showed the best results. Total phenolics scored 78 mg GAE/ 100 g of fresh pulp and flavonoids content was 68 mg CE/100 g of fresh pulp. Macaúba's pulp has intermediate antioxidant capacity, as showed through TEAC (9,6  $\mu$ mol TE/g) and ORAC (36  $\mu$ mol TE/g) methodologies. Important properties of macaúba, a very common but under explored fruit in Brazil, could be obtained from this study.

**Key words:** macaúba, (*Acrocomia aculeata*), lipase, antioxidant capacity, bioactive compounds.

# Sumário

Resumo	ix
Abstract	xi
Introdução Geral	1
<b>1 Revisão Bibliográfica</b>	<b>7</b>
1.1 A macaúba . . . . .	8
1.2 Enzimas vegetais . . . . .	13
1.2.1 Lipases . . . . .	17
1.2.2 Lipases vegetais . . . . .	22
1.3 Atividade antioxidante . . . . .	24
1.4 Propriedades bioativas em frutos regionais . . . . .	27
<b>2 Prospecção enzimática em macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) <i>Lodd. ex Mart.</i>)</b>	<b>37</b>
2.1 Introdução . . . . .	37
2.2 Material e métodos . . . . .	40
2.2.1 Obtenção do extrato enzimático bruto para prospecção enzimática . . . . .	40
2.2.2 Determinação da atividade enzimática . . . . .	41
2.2.2.1 Atividade de lipase . . . . .	41
2.2.2.2 Atividade de esterase . . . . .	42
2.2.2.3 Atividade de protease . . . . .	42
2.2.2.4 Atividade de $\alpha$ -amilase . . . . .	43
2.2.2.5 Atividade de celulase . . . . .	44
2.2.2.6 Atividade de pectinase . . . . .	45

2.2.2.7	Atividade de polifenoloxidase . . . . .	46
2.2.2.8	Atividade de peroxidase . . . . .	46
2.2.2.9	Atividade de fitase . . . . .	47
2.2.2.10	Atividade de tanase . . . . .	48
2.2.3	Determinação da concentração protéica . . . . .	49
2.3	Resultados e discussão . . . . .	49
2.3.1	Atividade de lipase . . . . .	50
2.3.2	Atividade de pectinase . . . . .	53
2.3.3	Atividade de peroxidase . . . . .	53
2.3.4	Atividade de polifenoloxidase . . . . .	54
2.4	Conclusões . . . . .	55
<b>3</b>	<b>Caracterização bioquímica da lipase de macaúba <i>Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.</i></b>	<b>63</b>
3.1	Introdução . . . . .	63
3.2	Material e métodos . . . . .	64
3.2.1	Obtenção do extrato enzimático bruto de lipase de macaúba . . . . .	65
3.2.2	Semipurificação do extrato enzimático bruto de lipase de macaúba . . . . .	66
3.2.2.1	Precipitação com acetona . . . . .	66
3.2.2.2	Fracionamento com sulfato de amônio . . . . .	67
3.2.3	Determinação da atividade lipolítica por titulação . . . . .	67
3.2.4	Determinação da atividade lipolítica por espectrofotometria . . . . .	68
3.2.5	Determinação da concentração protéica . . . . .	69
3.2.6	Caracterização enzimática da lipase de macaúba . . . . .	69
3.2.6.1	Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade da lipase de macaúba . . . . .	69
3.2.6.2	Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade da lipase de macaúba . . . . .	70
3.2.6.3	Efeito de sais na atividade da lipase de macaúba . . . . .	70
3.2.6.4	Efeito de ativadores, inibidores e surfactantes na atividade da lipase de macaúba . . . . .	70

3.2.6.5	Estabilidade da lipase de macaúba em solventes orgânicos . . . . .	71
3.2.6.6	Especificidade da lipase de macaúba . . . . .	72
3.2.7	Determinação da atividade de hidrólise de óleos e gorduras	73
3.2.8	Atividade de esterificação da lipase de macaúba . . . . .	74
3.2.9	Termoestabilidade enzimática da lipase de macaúba: determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos . . . . .	75
3.2.9.1	Constante de desnaturação ( $K_d$ ) . . . . .	76
3.2.9.2	Meia-vida ( $t_{1/2}$ ) . . . . .	77
3.2.9.3	Valor de redução decimal (valor $D$ ) . . . . .	77
3.2.9.4	Valor $Z$ . . . . .	77
3.2.9.5	Energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ ) . . . . .	78
3.2.9.6	Entalpia ( $\Delta H$ ) . . . . .	78
3.2.9.7	Energia livre ( $\Delta G$ ) . . . . .	79
3.2.9.8	Entropia ( $\Delta S$ ) . . . . .	79
3.3	Resultados e discussão . . . . .	79
3.3.1	Estudo da extração da lipase de polpa de macaúba . . . . .	79
3.3.2	Caracterização enzimática . . . . .	84
3.3.3	Aplicação da lipase de polpa de macaúba em reações de hidrólise e esterificação . . . . .	96
3.3.4	Termoestabilidade da lipase da polpa de macaúba . . . . .	98
3.4	Conclusões . . . . .	105
<b>4</b>	<b>Estudo dos compostos bioativos em macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.)</b>	<b>111</b>
4.1	Introdução . . . . .	111
4.2	Material e métodos . . . . .	114
4.2.1	Extração dos compostos fenólicos . . . . .	114
4.2.2	Compostos fenólicos totais . . . . .	117
4.2.3	Flavonoides . . . . .	117
4.2.4	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) . . . . .	118
4.2.5	ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) . . . . .	119
4.2.6	Atividade antimicrobiana . . . . .	121
4.2.6.1	Preparo de inóculo padronizado . . . . .	121

4.2.6.2	Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição . .	121
4.2.6.3	Leitura dos resultados . . . . .	122
4.2.7	Tratamento estatístico . . . . .	123
4.3	Resultados e discussão . . . . .	123
4.3.1	Fenóis totais . . . . .	126
4.3.2	Flavonoides . . . . .	129
4.3.3	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) . . . . .	130
4.3.4	ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) . . . . .	133
4.3.5	Correlações . . . . .	137
4.3.6	Atividade antimicrobiana . . . . .	138
4.4	Conclusões . . . . .	139
	<b>Conclusões Gerais</b>	<b>147</b>

# Lista de Tabelas

1.1	Composição média de ácidos graxos da amêndoa e polpa de macaúba. . . . .	12
1.2	Composição nutricional média da polpa de macaúba. . . . .	14
2.1	Atividade enzimática do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba. . . . .	50
2.2	Teor de proteína do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão. . . . .	51
2.3	Atividade enzimática do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão. . . . .	51
2.4	Atividade enzimática específica do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão. . . . .	51
3.1	Constante dielétrica e ET dos solventes testados na estabilidade da lipase de macaúba. . . . .	72
3.2	Atividade da lipase da polpa de macaúba durante o processo de semipurificação. . . . .	84
3.3	Perfil da taxa de desnaturação ( $K_d$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e redução decimal ( $D$ ) da lipase da polpa de macaúba. . . . .	102
3.4	Parâmetros de entalpia ( $\Delta H$ ), energia livre ( $\Delta G$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) da lipase da polpa de macaúba. . . . .	105
4.1	Solventes utilizados na extração de compostos fenólicos em macaúba. . . . .	125
4.2	Teores de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante em amêndoa de macaúba. . . . .	126

4.3	Teores de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante em polpa de macaúba. . . . .	127
4.4	Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em amêndoa de macaúba. . . . .	134
4.5	Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em polpa de macaúba. . . . .	135
4.6	Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em padrões e vitaminas comerciais. . . . .	136
4.7	Coefficiente de correlação linear entre os testes realizados na amêndoa de macaúba. . . . .	138
4.8	Coefficiente de correlação linear entre os testes realizados na polpa de macaúba. . . . .	139

# Lista de Figuras

1.1	Aspecto da palmeira <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart. . . . .	9
1.2	Aspectos do fruto da macaúba. a) Fruto inteiro; b) corte longitudinal mostrando a casca, polpa, endocarpo e amêndoa. . .	10
1.3	Reações catalisadas por lipases. Fonte: Paques e Macedo (2006) 18	
3.1	Teor de proteína dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com diferentes soluções tampão, expresso em mg proteína/g de polpa de macaúba. . . . .	80
3.2	Atividade específica de lipase dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com diferentes soluções tampão, expressa em U/mg de proteína. . . . .	80
3.3	Teor de proteína dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 com diferentes aditivos, expresso em mg proteína/g de polpa de macaúba. Controle: extraído com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 sem utilização de aditivos. . . . .	81
3.4	Atividade específica de lipase dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 com diferentes aditivos, expressa em U/mg de proteína. Controle: extraído com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 sem utilização de aditivos. . . . .	82
3.5	Temperatura ótima de atividade de lipase da polpa de macaúba. . . . .	85
3.6	Efeito da temperatura na estabilidade da lipase em polpa de macaúba. . . . .	86

3.7	pH ótimo de atividade de lipase da polpa de macaúba. . . . .	87
3.8	Efeito do pH na estabilidade da lipase da polpa de macaúba. . . . .	87
3.9	Efeito de diferentes sais na atividade da lipase da polpa de macaúba. . . . .	88
3.10	Efeito de ativadores e inibidores na atividade da lipase em polpa de macaúba. . . . .	89
3.11	Efeito de diferentes surfactantes na atividade da lipase em polpa de macaúba. . . . .	92
3.12	Efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade da lipase da polpa de macaúba. . . . .	93
3.13	Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes substratos naturais. . . . .	94
3.14	Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes substratos sintéticos. <i>p</i> -NPA: <i>p</i> -nitrofenil acetato, <i>p</i> -NPB: <i>p</i> -nitrofenil butirato, <i>p</i> -NPC: <i>p</i> -nitrofenil caprilato, <i>p</i> -NPL: <i>p</i> -nitrofenil laurato, <i>p</i> -NPP: <i>p</i> -nitrofenil palmitato. . . . .	95
3.15	Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes óleos e gorduras. . . . .	95
3.16	Porcentagem de esterificação de ácidos graxos utilizando-se a lipase da polpa de macaúba em até 48 horas de reação. . . . .	97
3.17	Estabilidade térmica da lipase da polpa de macaúba. . . . .	99
3.18	Cinética de desnaturação térmica da lipase da polpa de macaúba. . . . .	100
3.19	Linearização da redução decimal ( <i>D</i> ) para o cálculo do valor <i>Z</i> da lipase de polpa de macaúba. . . . .	102
3.20	Formalização dos cálculos experimentais por Arrhenius para o cálculo de $E_{ad}$ da lipase de polpa de macaúba. . . . .	104
4.1	Esquema do processo de extração de compostos fenólicos em polpa e amêndoa do fruto da macaúba. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity. . . . .	115
4.2	Fluxograma detalhado do processo de extração de compostos fenólicos em macaúba. . . . .	116

4.3	Cinética da capacidade antioxidante (TEAC) em polpa e amêndoa de macaúba. a: extrato concentrado da polpa; b: resíduo da polpa; c: extrato concentrado da amêndoa; d: resíduo da amêndoa. . . . .	131
-----	---	-----



# Lista de Abreviaturas

AAPH	2,2-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloreto
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AUC	<i>Area under curve</i> - Área abaixo da curva
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Catequina equivalente
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
CTT	2,3,5-cloreto de trifenil tetrazólio
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
GAE	Ácido gálico equivalente
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity.
PEG	Polietileno glicol
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
<i>p</i> NPA	<i>p</i> -nitrofenil acetato
<i>p</i> NPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
<i>p</i> NPC	<i>p</i> -nitrofenil caprilato
<i>p</i> NPL	<i>p</i> -nitrofenil laurato
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TE	Trolox equivalente
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity



# Introdução Geral

A importância das palmeiras é bastante expressiva, especialmente em regiões tropicais, devido à grande diversidade de produtos que podem ser obtidos de suas folhas, frutos e sementes (FAO, 2001; Moussouris e Regato, 1999). As palmeiras constituem-se em importantíssima fonte de recursos para a população das áreas rurais dos países tropicais em desenvolvimento. São geralmente utilizadas como alimentos, combustível, medicamentos caseiros, confecção de utensílios domésticos e, em alguns casos, como matéria-prima para as indústrias locais (Mollet et al., 2000).

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), pertence à família *Palmae*, encontrada em grande parte do território brasileiro (Lorenzi e Negrelle, 2006; Missouri Botanical Garden, 2009). Desta palmeira, pode-se aproveitar economicamente o caule, folhas e frutos. O fruto é de formato esférico, casca lisa e coloração variando de marrom a amarelada quando maduro. A polpa é amarela e aderida ao endocarpo que envolve a amêndoa. A polpa pode ser utilizada para consumo *in natura* ou para extração de óleo, utilizado na culinária e indústria de sabão. A amêndoa é utilizada para extração de óleo de ótima qualidade, fino e incolor, utilizado na indústria alimentícia e de

cosméticos. Apesar de seu grande valor comercial, o fruto da macaúba vem sendo explorado de forma extrativista, sendo todo o processo de descasamento realizado artesanalmente (Souza et al., 2006).

O Brasil ocupa uma posição privilegiada no cenário mundial em relação à produção e utilização de enzimas, devido à abundância de matéria-prima a ser utilizada em processos fermentativos e extrativos e à enorme quantidade de biomassa a ser transformada por via enzimática em produtos diversificados e de maior valor agregado. O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria, apresentam perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas, que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários (Lorenzi, 2006).

Este trabalho teve como principal objetivo realizar uma caracterização bioquímica do fruto da palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., investigar quais são as enzimas presentes na polpa e amêndoa do fruto e avaliar as propriedades bioquímicas da lipase presente no extrato bruto da polpa de macaúba, uma vez que esta foi a enzima com maior atividade, demonstrando possuir potencial para aplicação tecnológica. A caracterização bioquímica trata também da ocorrência de compostos com propriedades antioxidantes e da determinação da capacidade antioxidante em amêndoa e polpa de macaúba.

O primeiro capítulo traz uma revisão bibliográfica sobre o tema, discorrendo sobre as principais características do fruto, propriedades e aplicações

de enzimas vegetais, em especial lipases, e sobre a ocorrência de propriedades antioxidantes e suas determinações.

O capítulo dois concentra a prospecção inicial realizada na polpa e amêndoa com objetivo de investigar a presença ou ausência de algumas enzimas na amostra.

O capítulo três descreve o processo de extração e a caracterização bioquímica do extrato bruto da lipase de polpa de macaúba. Relata as características da enzima em relação à sua atividade catalítica, como temperatura ótima de atividade e estabilidade, efeito do pH ótimo de atividade e estabilidade da enzima, estudo do efeito de íons e de alguns ativadores e inibidores da atividade enzimática, termoestabilidade da enzima e sua estabilidade em solventes orgânicos. Também descreve sobre a possibilidade de aplicação desta lipase em reações de hidrólise e síntese de ésteres.

O quarto e último capítulo aborda o estudo da ocorrência e determinação quantitativa de compostos bioativos, que ainda não haviam sido determinados neste fruto, como fenóis totais e flavonoides, e também da capacidade antioxidante expressa em suas frações.

Este trabalho traz uma significativa contribuição ao estudo das características bioquímicas da polpa e amêndoa da macaúba, investigando vários aspectos deste fruto de ocorrência bastante ampla no território brasileiro, porém pouco explorado científica e tecnologicamente.

## Referências Bibliográficas

- FAO (2001). Resource assessment of non-wood forest products: experience and biometric principles. Technical report, Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Roma.
- Lorenzi, G.; Negrelle, R. (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.: aspectos ecológicos. *Visão Acadêmica, América do Sul*, 7(1).
- Lorenzi, G. M. A. C. (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - *Areaceae*: Bases para o extrativismo sustentável. Tese de Doutorado. *Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR*, 172p.
- Missouri Botanical Garden (2009). *Acrocomia aculeata*. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/treat/acoelorrapphe.shtml>. Acesso em: 09/08/2009.
- Mollet, M.; Herzog, F.; Behi, Y. E. N.; Farah, Z. (2000). Sustainable exploitation of *Borassus aethiopum* and *Elaeis guianensis* and *Raphia hookeri* for the extraction of palm wine in Côte D'Ivoire Environment. *Development and Sustainability*, 2:43 – 57.
- Moussouris, Y.; Regato, P. (1999). Forest harvest: an overview of non timber products in Mediterranean region Roma. *FAO Document Repository*.
- Souza, F. C.; Gomes, D.; Ferraz, A.; Inamasu, R. Y. (2006). Caracterização

física e mecânica do fruto da macaúba. In *XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - João Pessoa - PB.*



# Capítulo 1

## Revisão Bibliográfica

A região do Cerrado abrange uma área de 204 milhões de hectares, distribuídos principalmente nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal, correspondendo a aproximadamente 22% do território brasileiro. O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho somente para a Floresta Amazônica (Roesler et al., 2007).

O Cerrado apresenta cerca de 2000 espécies arbustivas-arbóreas e cerca de 5000 espécies herbáceo-subarbustivas compondo sua flora, sendo que esta é uma região de grande importância devido à sua biodiversidade. No entanto, devido ao processo acelerado de ocupação agrícola do Cerrado e à exploração extrativista e predatória, tem-se observado quedas anuais significativas nas safras dos produtos regionais (Silva et al., 2001). Nos últimos 30 anos, a progressiva mecanização da lavoura e a facilidade de limpar e adubar a terra vem contribuindo para uma devastação acelerada de vegetação nativa e estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido desmatado e substituído por lavouras

de soja e por pastos para a criação extensiva de gado de corte (Roesler et al., 2007).

Os frutos nativos do Cerrado, base de sustentação da vida silvestre e fonte de alimento para as populações rurais, possuem enorme valor nutritivo. A comercialização das frutas nativas do Cerrado é realizada às margens das rodovias, em alguns mercados e em feiras da região, com grande aceitação popular. Além de consumidas *in natura*, essas frutas podem ser transformadas em sucos, sorvetes, licores, pães e bolos. Muitas espécies nativas do cerrado, tais como, murici, guapeva, gabioba, araticum, cagaita, mangaba, lobeira, baru, macaúba, jatobá e outros, possuem características peculiares, formas variadas, cores atrativas e sabores característicos; constituindo importantes fontes com potencial de exploração econômica.

## 1.1 A macaúba

*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., é uma espécie nativa com ampla distribuição geográfica em território brasileiro, especialmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Figura 1.1). Os frutos são esféricos ou ligeiramente achatados, em forma de drupa globosa com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm. O epicarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é comestível, fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado e coloração amarela. O endocarpo é fortemente aderido à polpa, com parede

óssea enegrecida de aproximadamente 3 mm de espessura, e a amêndoa é oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento (Silva et al., 1994) (Figura 1.2). A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro (Scariot, 1998).



Figura 1.1: Aspecto da palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

No Brasil, o fruto da palmeira *Acrocomia aculeata* é conhecido por bocaiúva, macaúba, macaúva, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-espinho, macaiba, macaibeira, macajuba, mucaia, mucaja e mucajaba (Teixeira, 1996).

Esta espécie de palmeira é considerada importante do ponto de vista eco-

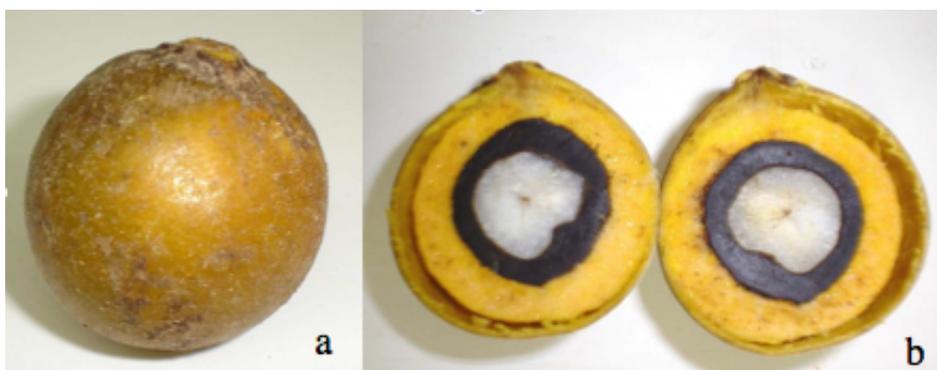


Figura 1.2: Aspectos do fruto da macaúba. a) Fruto inteiro; b) corte longitudinal mostrando a casca, polpa, endocarpo e amêndoa.

lógico, pois serve de recurso alimentar para diferentes espécies da fauna local, coloniza áreas degradadas e é bem representada na região (Lorenzi et al., 1996).

Não há registro de processamento industrial de frutos de macaúba. Na região Centro-Oeste pequenas indústrias familiares localizadas em municípios de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul produzem, principalmente, farinha, sorvete e licor. Além do comércio local, estes produtos são vendidos em outras cidades da região e, também, em alguns estabelecimentos vinculados a atividades turísticas de Cuiabá, Campo Grande e Corumbá.

Lorenzi (2006) identificou diferentes categorias de uso associadas a distintas partes de *A. aculeata*, através de entrevistas com pequenos produtores e registros na literatura. Dentre os usos mais referenciados destacam-se o medicinal e alimentício. A polpa é mais frequentemente utilizada na produção de sorvete, licor e goma de mascar; a amêndoa é geralmente consumida *in natura* ou na forma de paçoca, sendo seu óleo usado em algumas comunidades como

óleo de cozinha ou como ingrediente para sabão.

No Pantanal, toda a planta é muito utilizada pela população. As folhas podem ser usadas para suplementação alimentar de cavalos e bois. A madeira serve para parede, caibro e ripa. Os frutos (polpa e castanha) são muito apreciados tanto pelo homem como pela fauna doméstica e silvestre. Em sua maioria, os produtos advindos de *A. aculeata* estão associados a um baixo grau de transformação, correspondendo ao uso de partes frescas, diretamente consumidas. A polpa e a farinha de bocaiúva possuem grande mercado potencial, inclusive para outros Estados do Brasil, podendo ser usadas em vitaminas, fabricação do sorvete, bolos e pães, agregando maior valor nutritivo à merenda escolar, pois são também produtos ricos em cálcio e potássio (Lorenzi, 2006).

A macaúba apresenta potencial para tornar-se a palmeira oleaginosa mais importante comercialmente no contexto brasileiro. Seus frutos contêm 20 a 30% de óleo, 5% de farinha comestível, 35% de tortas forrageiras e 35% de combustível de alto poder calórico (Silva et al., 1994). É considerada uma espécie com alta potencialidade de fornecimento de óleo para a produção de biodiesel (Silva et al., 1994; Fortes e Baugh, 1999).

O óleo da polpa de macaúba tem alto teor de ácido graxo monoinsaturado, demonstrando seu potencial como fonte de ácido oléico. Aliado à sua composição de ácidos graxos, o alto teor de tocoferóis (213 mg/Kg) e carotenoides contribuem para que o óleo da polpa de macaúba seja adequado ao consumo humano, uma vez que possui propriedades compatíveis a outros óleos vegetais

Tabela 1.1: Composição média de ácidos graxos da amêndoa e polpa de macaúba.

Ácidos graxos	Amêndoa (%)	Polpa (%)
Caprílico (C8:0)	3,7 - 6,0	0,5
Cáprico (C10:0)	1,8 - 2,8	0,3
Láurico (C12:0)	12,9 - 50,9	0,39 - 2,0
Mirístico (C14:0)	9,2 - 13,1	0,38 - 0,45
Palmítico (C16:0)	7,6 - 12,6	15,9 - 24,6
Palmitoléico (C16:1)	2,3	1,0 - 4,3
Estearíco (C18:0)	2,2 - 6,6	1,1 - 5,9
Oléico (C18:1)	17,9 - 40,2	52,6 - 65,9
Linoléico (C18:2)	2,5 - 5,9	5,1 - 13,8
Linolênico (C18:3)	1,92	2,3 - 2,5

*Fonte: (Belén-Camacho et al., 2005; Hiane et al., 2005; Coimbra e Jorge, 2012)*

de boa qualidade (Coimbra e Jorge, 2012). Desta forma, vislumbra-se como outra importante alternativa, a revitalização do uso do óleo de bocaiúva como óleo de cozinha dado sua similaridade com o azeite de oliva (Ramos et al., 2007). Adicionalmente, cita-se como igualmente importante a aplicabilidade do óleo pela indústria cosmética na fabricação de hidratantes, sabonetes e xampus devido os altos valores de ácidos graxos (Silva et al., 1994).

A composição de ácidos graxos da amêndoa de macaúba revela uma alta concentração em ácido láurico (13 a 51%) e também alto teor de ácido oléico (18 a 40%). A Tabela 1.1 mostra a faixa de concentração dos ácidos graxos encontrados na amêndoa (Hiane et al., 2005; Belén-Camacho et al., 2005; Coimbra e Jorge, 2012) e na polpa da macaúba (Hiane et al., 2005).

Hiane et al. (1990) observaram que 89% do total de carotenoides encon-

trados na polpa da macaúba correspondem a  $\beta$ -caroteno. Ramos et al. (2007) encontraram 49,0  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno na polpa deste fruto, representando 82% do total de carotenoides encontrado, indicando ser uma boa fonte de carotenoide e vitamina A. A polpa da macaúba é rica em óleos com alto teor de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico, que pode influenciar positivamente na alta biodisponibilidade do carotenoide (Hiane et al., 2005).

O valor nutritivo de frutos do cerrado, incluindo a macaúba, foi estudado por Silva et al. (2008). A macaúba é um fruto de alto valor energético e baixo teor de umidade, devido principalmente a alta concentração de lipídios tanto na polpa quanto na amêndoa. A Tabela 1.2 mostra a composição centesimal e concentração de alguns minerais na polpa de macaúba.

A polpa representa cerca de 44% da massa total do fruto, enquanto a amêndoa corresponde a 3,8% (Ramos et al., 2008). A porção comestível do fruto representa bom rendimento do ponto de vista tecnológico e nutricional, mostrando-se apta a contribuir para o enriquecimento nutricional e também econômico da população regional.

## 1.2 Enzimas vegetais

O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem constituir em fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento. As enzimas de origem vegetal são produzidas em grande

Tabela 1.2: Composição nutricional média da polpa de macaúba.

Componentes		Amêndoa	Polpa
Valor energético	(Kcal/100g)	561,23	285,65
Umidade	(g/100g)	6,5	34,32
Proteínas	(g/100g)	17,57	2,76
Lipídios	(g/100g)	51,71	14,93
Carboidratos	(g/100g)	5,39*	35,06**
Fibra alimentar	(g/100g)	17,23	11,14
Cinzas	(g/100g)	1,99	1,78
Cálcio	(mg/100g)	95,3	202,3
Fósforo	(mg/100g)	537,5	36,7
Potássio	(mg/100g)	377,2	766,4
Zinco	(mg/100g)	30,93	1,7
Ferro	(mg/100g)	32,91	1,8
Magnésio	(mg/100g)	207,0	92,3

\* açúcares redutores e não redutores; \*\* teor de carboidratos medido por diferença.

Fonte: (Silva et al., 2008; Marin et al., 2009; Ramos et al., 2008; Hiane et al., 2006)

parte como subprodutos da atividade agrícola. Dentre as enzimas vegetais destacam-se as enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase. Nos vegetais, essas enzimas podem causar reações químicas indesejáveis. Em frutos, o escurecimento dos tecidos ocorre principalmente pela reação de oxidação enzimática dos compostos fenólicos a qual é catalisada pela atividade de duas enzimas: a polifenoloxidase e a peroxidase (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). As polifenoloxidases são proteínas contendo cobre, diferindo das peroxidases que são heme-proteínas.

A peroxidase (EC 1.11.1.7) é encontrada em tecidos de vegetais e animais. A peroxidase catalisa a oxidação pelo peróxido de hidrogênio de alguns substratos como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis, entre outros. Contribui com alterações deteriorativas no aroma, sabor, textura, cor e valor nutricional de frutas e verduras. É conhecida como uma enzima termoestável que pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico. Diversas são as fontes dessa enzima, como pêsego, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo e aspargo (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

A polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) catalisa a oxidação tanto de monofenóis, como tirosina, fenol e *p*-cresol; e difenóis, e.g., catecol, L-dopa, dopamina e adrenalina. É largamente distribuída na natureza e encontrada nos tecidos de kiwi, arroz, abacate, pêra, maçã, morango, uva, folha de espinafre, palmito, banana, batata inglesa, batata doce, pêsego, manga, berinjela, inhame entre outros. É a principal enzima responsável pelo escurecimento que ocorre em

verduras e frutas devido a injúrias, estocagem ou durante o processamento (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

No grupo das hidrolases, enzimas que catalisam reações de hidrólise de várias ligações covalentes, destacam-se as proteases e as lipases.

As proteases, pertencentes à classe 3 e sub-classe 3.4, catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e ainda podem apresentar atividade sobre éster e amida. Dentre todas as enzimas produzidas e utilizadas em escala comercial, 75% são hidrolases e, dessas, 60% são proteases. As proteases são produzidas por animais, vegetais e micro-organismos. As proteases vegetais são bastante empregadas na indústria de alimentos, sendo a papaína, bromelina e ficina, as mais usadas (Koblitz, 2008).

Dentre as carboidrases, a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) pode ser encontrada em fontes vegetais, principalmente em sementes amiláceas durante a germinação. São endocarboidrases que hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas de amilose e amilopectina. São bastante aplicadas na indústria de alimentos, em processos de fermentação e hidrólise de amido. A celulase também é uma carboidrase capaz de romper ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da celulose e derivados. As pectinases são encontradas em diversas frutas e vegetais, tendo como substrato polissacarídios constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Podem ser classificadas em desmetoxilantes (pectinesterase) e despolimerizantes (endo e exo-poligalacturonase, endo e exo-pectatoliase e endo-pectinaliase), dependendo do substrato onde atuam e de seu mecanismo

de ação. As pectinases são bastante usadas na indústria de alimentos, para a clarificação e extração de sucos, e também extração de óleos, principalmente de mesocarpo, como palma e oliva (Koblitz, 2008).

### 1.2.1 Lipases

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (E.C.3.1.1.3). Catalisam a clivagem de triacilglicerois liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além da hidrólise de ésteres podem catalisar também reações de esterificação, interesterificação, alcoólises, acidólises, aminólises e lactonização, sendo que a atividade de água do meio é um fator determinante em cada classe de reação (Figura 1.3). Esta versatilidade permite que as lipases sejam utilizadas em síntese regioseletiva ou resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas, dando origem a ésteres ou amidas opticamente ativos. Tais características ampliam as possibilidades de aplicação das lipases em diversos setores da indústria (Freire e Castilho, 2008). Além do que, as lipases possuem capacidade de catalisar reações com uma grande variedade de substratos sintéticos, permitindo o seu uso para a obtenção de diversos tipos de compostos.

Quanto à especificidade as lipases podem ser divididas em (Villeneuve, 2003; Paques e Macedo, 2006):

- Substrato específicas: a especificidade em relação ao substrato é definida

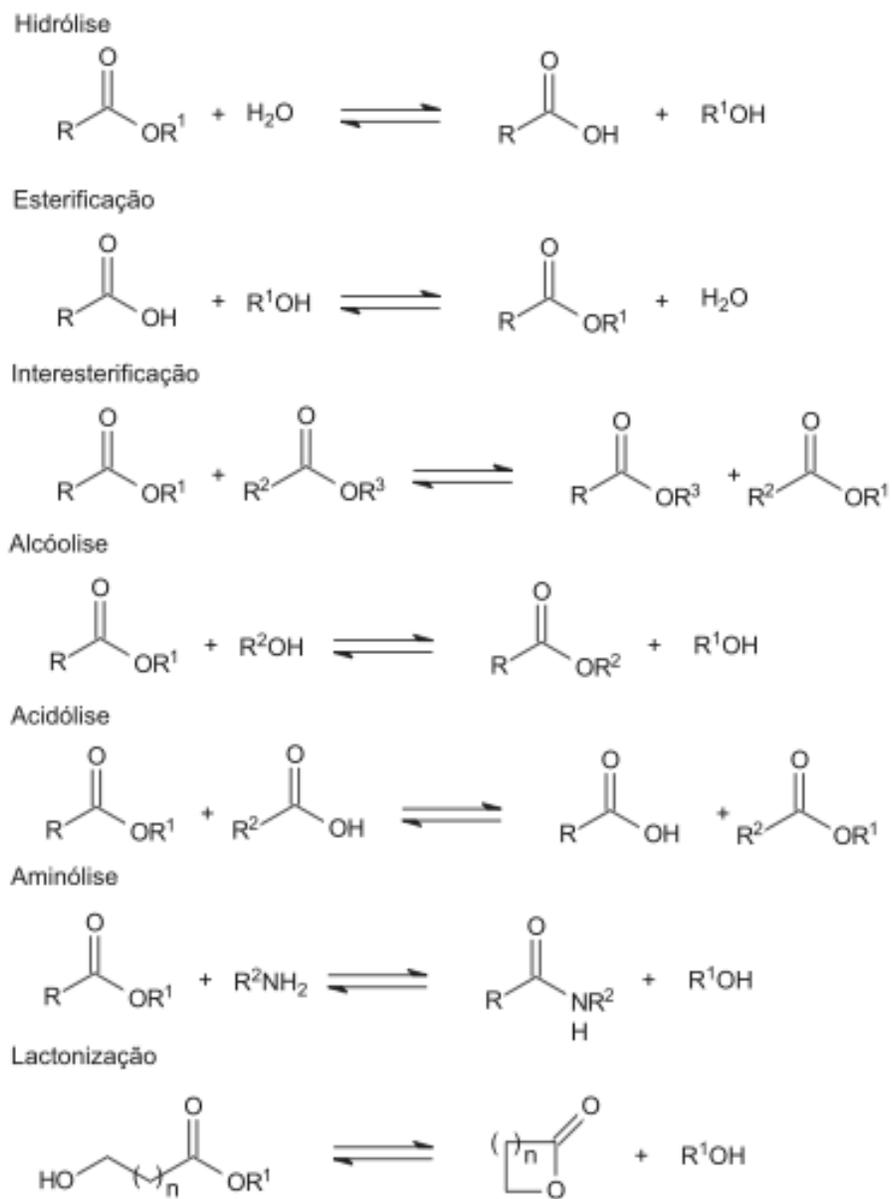


Figura 1.3: Reações catalisadas por lipases. Fonte: Paques e Macedo (2006)

como a habilidade da lipase hidrolisar preferencialmente um tipo de éster de glicerol. Estas enzimas são hábeis para catalisar não somente as hidrólises de triacilglicerois (TAGs) mas também di e monoacilgliceróis e fosfolipídeos no caso de fosfolipases .

- Regiosseletivas: a especificidade em relação a posição é a habilidade que a enzima tem de distinguir entre as duas posições externas do triacilglicerol (éster primário) e a posição interna (éster secundário).

I. lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;

II. lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos dos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3.

- Ácido graxo específica ou tipo seletiva: trata-se da especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ ou ao número de insaturação do grupo acila.
- Enantiosseletiva: habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. A enantioespecificidade das lipases pode mudar com o substrato. Esta mudança pode ser relacionada à natureza química do éster.

As lipases podem ser encontradas em tecidos animais e vegetais, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos.

Em eucariotos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo, incluindo digestão de gordura, absorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia e as sementes oleaginosas provavelmente usam estas enzimas durante os primeiros estágios de germinação, iniciando a metabolização de triacilglicerois estocados através da hidrólise de suas ligações ésteres (Sharma et al., 2001). Os ácidos graxos liberados fornecem energia para o crescimento do embrião.

Dentre os processos biológicos utilizados nas biotransformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese. São biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Muitas enzimas ou complexos enzimáticos possuem atividade em meios hidrofóbicos, com grau de eficiência que permite sua utilização em síntese orgânica, igual ou superior ao encontrado em meio aquoso, utilizado nas reações de hidrólise. Como as enzimas permanecem na sua conformação original, isto permite seu uso nos processos catalíticos em meio orgânico. O fato da cadeia não se desdobrar em meio não aquoso está relacionado às interações eletrostáticas entre os grupos que compõem as enzimas. Devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e o aumento do número de pontes de hidrogênio intramoleculares, há maior interação eletrostática.

O processo de extração das enzimas vegetais é de extrema importância,

pois sua facilidade e conseqüentemente o menor custo do processo determinam a viabilidade de seu emprego industrial. A complexidade do processo de extração e o baixo rendimento são desvantagens da obtenção de enzimas vegetais em comparação às enzimas microbianas. Além disso, a produção que pode estar limitada ao período de germinação e a baixa estabilidade da enzima são características desfavoráveis à produção industrial de lipases vegetais. No entanto, as lipases vegetais apresentam vantagens competitivas pela facilidade de obtenção, abundância e, principalmente, pelo fato de não necessitarem alto grau de purificação (Villeneuve, 2003).

Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas em reações de síntese. No entanto, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção. Com o objetivo de intensificar a utilização de lipases em escala piloto e industrial, estudos de fontes vegetais, como sementes, látex, folhas e caules, têm crescido nos últimos anos. Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de sementes de oleaginosas, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a germinação (Polizelli, 2008).

Os ésteres possuem muitas aplicações em alimentos, cosméticos, medicamentos e na formulação de outros produtos químicos. Comparado com a síntese convencional, utilizando catalisadores químicos, as reações biocatalisadas possuem algumas vantagens, como por exemplo uma única etapa no

processo e condições reacionais moderadas.

O uso de lipases e esterases como biocatalisadores, na síntese de ésteres, em substituição aos catalisadores utilizados nos processos químicos, permite a redução da temperatura e da pressão do processo e, conseqüente aumento na segurança. Outro fator relevante do uso de biocatalisadores é a redução dos impactos ambientais, principalmente em relação ao consumo de energia e geração de resíduos decorrentes da utilização de catalisadores químicos. O consumo de energia causa um impacto significativo no custo dos produtos, principalmente quando há necessidade do emprego de altas temperaturas, como ocorre em processos químicos para obtenção de ésteres de ácidos graxos. Os biocatalisadores tem uma toxicidade significativamente menor que os catalisadores químicos, além de serem produzidos por recursos renováveis. A qualidade dos produtos obtidos por via biocatalítica caminha para o que se chama de processo “limpo”, facilitando o enquadramento dos mesmos nas exigências de regulamentação dos produtos para fins alimentícios ou que entrem em contato direto com alimentos (Barros et al., 2010).

### **1.2.2 Lipases vegetais**

A atividade lipolítica em fontes vegetais já foi determinada em diferentes partes da planta, caule, látex, polpa e semente; no entanto, as maiores atividades foram determinadas em sementes. Durante a germinação de sementes

oleaginosas, a gordura armazenada é usada, iniciando-se com a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, sendo esta fase a de maior atividade lipolítica em sementes.

A maioria dos estudos sobre atividade lipolítica vegetal trata de sementes oleaginosas e cereais. As fontes mais estudadas são lipases de óleo de semente de mamona, canola, linhaça e aveia (Villeneuve, 2003).

Dentre as lipases de mesocarpos, as mais estudadas são a de oliva e de palma. O óleo de palma, extraído do mesocarpo de dendê, apresenta atividade lipolítica máxima de 200 U/g de mesocarpo de dendê, usando óleo de oliva como substrato. A enzima não se mostrou ativa em pH abaixo de 7,0 ou acima de 11,5; alcançando seu ponto ótimo entre pH 9,0 e 10,0. A temperatura ótima encontrada foi de 45 °C, e a enzima se mostrou estável em temperaturas entre 20 e 50 °C (Ebongue et al., 2006). Estes resultados divergem dos resultados encontrados por Sambanthamurthi et al. (1995), que encontraram atividade ótima de lipase de óleo de palma em pH 7,5 e temperatura de 18 °C, e de Abigor et al. (1985), que indicaram atividade ótima em pH 4,5 e temperatura de 30 °C. Sambanthamurthi et al. (2000) estudaram a atividade lipolítica de diferentes genótipos de óleo de palma, *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*, encontrando ampla faixa de atividade diferenciando as duas espécies e também diferentes amostras da mesma espécie. Tais resultados confirmam a presença de lipase em mesocarpo de palma e também sua dependência genotípica.

### 1.3 Atividade antioxidante

O estresse oxidativo pode causar sérios danos às biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídeos, sendo capaz de originar doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares. Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (Chun et al., 2005). Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídeos, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis.

A importância de compostos antioxidantes naturais vem despertando grande interesse entre cientistas e consumidores, por apresentarem uma tendência mundial em relação aos alimentos funcionais com benefício específico de saúde. É crescente a atenção dispensada aos polifenóis pela classe médica e científica. A razão deste interesse está em suas propriedades antioxidantes. Diversos estudos epidemiológicos sugerem a importância do consumo elevado dos produtos derivados de plantas, sobretudo frutas e verduras, na redução da incidência de doenças degenerativas (Velioglu et al., 1998).

Os compostos fenólicos estão presentes na maioria das frutas e verduras

e possuem um importante papel na proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, protegendo desde o código genético até aos lipídios e, desta forma, podendo inibir as etapas iniciais de processos carcinogênicos. A biodisponibilidade dos compostos fenólicos apresenta papel determinante nos possíveis efeitos biológicos a eles atribuídos. Fatores que influenciam a atividade fisiológica de tais compostos no organismo são: a estrutura do composto e a forma em que se apresenta livre, aglicona, ou ligada a outros compostos. Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes também na forma de glicosídeos. A ação de enzimas pode, no entanto, liberar as correspondentes agliconas, às quais se atribui maior capacidade antioxidante que aos glicosídeos correspondentes (Rice-Evans et al., 1996).

A maioria dos flavonoides possui habilidade de sequestrar os radicais livres. Alguns flavonoides podem agir como antioxidantes pela reação direta com radicais para formar produtos menos reativos. Já outros flavonoides são fortes inibidores de certas enzimas metabólicas que geram como produtos radicais livres, tais como cicloxigenase, lipoxigenase, monoamina oxidase e xantina oxidase. Ao lado da ação biológica dos compostos naturais como vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno e outras substâncias químicas de frutas e verduras que funcionam também como antioxidantes estão ganhando importância e com isso cresce cada vez mais o estudo destas como agentes contra a degradação oxidativa. Os compostos polifenólicos atuam por mecanismos variados dependendo

da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento, podendo existir sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos (Hassimotto et al., 2005).

Há várias metodologias usadas com frequência para medir a capacidade antioxidante de frutas, vegetais e sementes. Os métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante podem ser, de maneira geral, classificados em dois grupos, dependendo do mecanismo de reação: métodos baseados em transferência de hidrogênio, conhecidos por HAT (hydrogen atom transfer) ou em transferência de elétrons, ET (electron transfer). Os métodos mais usados, que envolvem a doação de átomo de hidrogênio, são o ORAC (oxygen radical absorption capacity), TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) e inibição de oxidação do ácido linolênico. Dentre os métodos caracterizados pela transferência de elétrons, os mais conhecidos são o TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) e DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Zulueta et al., 2009).

Os ensaios ET medem a capacidade redutora de um antioxidante, que altera a cor da reação, sendo que o grau de alteração da cor é diretamente proporcional à concentração de compostos antioxidantes. Dentre os métodos ET, o mais utilizado é o TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Os métodos HAT quantificam a capacidade de um composto doar um átomo de hidrogênio, em que antioxidante e substrato competem pelos radicais peróxilas gerados na reação. Dentre essas metodologias, o método ORAC (oxygen

radical absorption capacity) é mais usado e também o único a utilizar um radical biologicamente relevante (Thaipong et al., 2006; Zulueta et al., 2009).

A metodologia ORAC é a única a medir a ação de um antioxidante durante toda a reação e consegue combinar em um mesmo resultado o percentual de inibição e o período de tempo da ação do antioxidante sobre um radical livre. Um outro diferencial desta metodologia e a razão pela qual ela é considerada mais significativa para determinação da capacidade antioxidante, é que o radical usado (APPH) é biologicamente relevante (Prior e Cao, 1999; Ou et al., 2001).

## **1.4 Propriedades bioativas em frutos regionais**

Há várias espécies de frutos comestíveis no Brasil que são pouco conhecidos e pouco explorados, mas que possuem características interessantes para a agroindústria e como incremento de renda e fonte nutricional para a população regional. O consumo de frutos tropicais está em ascensão, tanto no mercado nacional quanto internacional, devido ao reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico (Rufino et al., 2010). No cerrado brasileiro, há diversas espécies vegetais com características sensoriais peculiares e alto valor nutritivo, que podem representar uma oportunidade para que os produtores locais tenham acesso a mercados especializados, já que há evidências da preferência de consumidores por frutos "exóticos", com propriedades nutracêuticas.

Recentemente, frutos brasileiros têm sido objeto de estudo sobre suas propriedades nutricionais e bioativas (Rufino et al., 2010; Souza et al., 2012; Almeida et al., 2011). A caracterização físico-química de frutos tropicais, exóticos ou não, e a investigação de suas propriedades funcionais, decorrentes das altas concentrações de vitaminas, minerais, compostos fenólicos e carotenoides, tem sido de crescente interesse da comunidade científica.

Souza et al. (2012) estudaram algumas propriedades bioativas em frutos do cerrado, como marolo, murici, jenipapo e graviola, encontrando alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, principalmente em marolo, que apresenta, respectivamente, 740 mg GAE/100 g de polpa e 131  $\mu\text{mol TE/g}$  de polpa. Graviola e murici também apresentaram alta atividade antioxidante.

Haminiuk et al. (2011) analisaram frutos exóticos da região sudeste do Brasil, uvaia, araçá, jabuticaba, cambuci e gabirola, em relação aos teores de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, atividade antioxidante e antimicrobiana. Dentre os frutos testados, jabuticaba e uvaia apresentaram maior atividade antioxidante. O teor de fenóis totais foi bastante variável, com valores de 9,55 mg GAE/g para jabuticaba e 107,69 mg GAE/g para cambuci, ambos em base seca.

Os principais biomas brasileiros, Amazônia e Cerrado, apresentam inúmeras espécies vegetais de grande potencial nutricional e funcional, que devem continuar atraindo a atenção da comunidade científica para a investigação de suas propriedades bioativas e diversificação do seu uso.

## Referências Bibliográficas

- Abigor, D. R.; Opute, F. I.; Opoku, A. R.; Osagie, A. U. (1985). Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36:559–606.
- Almeida, M.; de Souza, P. H. M.; Arriaga, A.; do Prado, G.; Magalhães, C. E. C.; Maia, G.; de Lemos, T. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44:2155–2159.
- Barros, M.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties: a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1):15–29.
- Belén-Camacho, D. R.; López, I.; García, D.; González, M.; Moreno-Álvarez, M. J.; Medina, C. (2005). Evaluación fisico-química de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata* Jacq.). *Grasas y Aceites*, 56:311–316.
- Chun, O. K.; Kim, D.; Smith, N.; Schroeder, D.; Han, J. T.; Lee, C. Y. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of Science and Food Agricultural*, 85:1715–1724.

- Coimbra, M. C.; Jorge, N. (2012). Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal of Science and Food Agricultural*, 92:679–684.
- Ebongue, G. F. N.; Dhoub, R.; Carrière, F.; Zollo, P. H. A.; Arondel, V. (2006). Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:611–617.
- Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. (2002). Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, 25:455–464.
- Fortes, I.; Baugh, P. (1999). Study of Analytical On-line Pyrolysis of Oils from Macauba Fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M) via GC/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 10(6):469–477.
- Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. (2008). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*, cap. 16 - Lipases em Biocatálise, p. 369–386. Ed. Interciência.
- Haminiuk, C. W. I.; Plata-Oviedo, M. S. V.; Guedes, A. R.; Stafussa, A. P.; Bona, E.; Carpes, S. T. (2011). Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, 46:1529–1537.
- Hassimotto, M.; Genovese, I.; Lajolo, M. (2005). Antioxidant activity of

dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2928–2935.

Hiane, P. A.; Baldasso, P. A.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. (2006). Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva and *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3):683–689.

Hiane, P. A.; Penteado, M. V. C.; Badolato, E. (1990). Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiúva. *Alimentos e Nutrição*, 2:21–26.

Hiane, P. A.; Ramos, M. M.; Ramos, M. I. L.; Macedo, M. L. R. (2005). Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(3):256–259.

Koblitz, M. G. B. (2008). *Bioquímica de alimentos: Teoria e aplicações práticas*. Guanabara Koogan.

Lorenzi, G. M. A. C. (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - *Areaceae: Bases para o extrativismo sustentável*. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 172p.

Lorenzi, H.; Souza, H.; Medeiros-Costa, J.; Cerqueira, L.; Behr, N. (1996). *Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas*. Ed. Plantarum.

- Marin, A. M. F.; Siqueira, E. M. A.; Arruda, S. A. (2009). Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60:177–187.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4619–4626.
- Paques, F. W.; Macedo, G. A. (2006). Lipase de látex vegetais: propriedade e aplicações industriais. *Quimica Nova*, 29(1):93–99.
- Polizelli, P. P. (2008). *Caracterização bioquímica de lipase extraída de sementes oleaginosas de Pachira aquatica*. Tese de Doutorado, UNESP - São José do Rio Preto - SP, 126p.
- Prior, R. L.; Cao, G. (1999). In Vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison Of Different Analytical Methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11/12):1173–1181.
- Ramos, M. I. L.; Filho, M. M. R.; Hiane, P. A.; Neto, J. A. B.; Siqueira, E. M. A. (2008). Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (supl.):90–94.
- Ramos, M. I. L.; Siqueira, E. M. A.; Isomura, C. C.; Barbosa, A. M. J.; Arruda, S. F. (2007). Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) Impro-

- ved Vitamin A Status in Rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55:3186–3190.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.; Papanga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoides and phenolics acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20:933–956.
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L.; Pastore, G.; Holanda, R. B.; Souza, C. A. (2007). Atividade antioxidante de frutos do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:53–60.
- Rufino, M.; Alves, R.; de Brito, E.; Péres-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121:996–1002.
- Sambanthamurthi, R.; Khaik-Cheang, O.; Parman, S. H. (1995). Factors affecting lipase activity in *Elaeis quineensis* mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33:353–359.
- Sambanthamurthi, R.; Rajanaidu, N.; Parman, S. H. (2000). Screening for lipase activity in the oil palm. *Biochemical Society Transactions*, 28:769–770.
- Scariot, A. (1998). Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes*, 42(1):5–8.

- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. (2001). Production and purification and characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627–662.
- Silva, D. B.; Silva, J. A.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. M. (2001). Frutas do Cerrado. Technical report, Brasília: EMBRAPA. 178p.
- Silva, J. A.; Silva, D. B.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. N. (1994). Frutas nativas dos cerrados. Comunicado Técnico. *EMBRAPA-CPAC: EMBRAPA-SPI, Brasília*, 166p.
- Silva, M. R.; Lacerda, D. B. C. L.; Santos, G. G.; Martins, D. M. O. (2008). Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, 38(6):1790–1793.
- Souza, V. R.; Pereira, P. A. P.; Queiroz, F.; Borges, S. V.; j. D. S. Carneiro (2012). Determination os bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, 134:381–386.
- Teixeira, E. (1996). *Frutas no Brasil. Acrocomia aculeata*. São Paulo: Empresa das Artes.
- Thaipong, K.; Boonprakoba, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS and DPPH and FRAP and and ORAC

assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675.

Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits and Vegetables and Grain Products. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 46:4113–4117.

Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science Technology*, 105:308–317.

Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114:310–316.



## Capítulo 2

# Prospecção enzimática em macaúba (*Acrocomia aculeata* (*Jacq.*) *Lodd. ex Mart.*)

### 2.1 Introdução

O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria, apresentam perspectivas promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas, que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários (Lorenzi, 2006). Neste contexto, o Brasil ocupa uma posição privilegiada, devido à abundância de matéria-prima a ser utilizada em processos fermentativos e extrativos e à enorme quantidade de biomassa a ser transformada por via enzimática em produtos diversificados e de maior valor agregado.

Há várias enzimas de interesse científico e comercial que podem ser extraídas de fontes vegetais, incluindo subprodutos da agroindústria. O número

de investigações em enzimas de origem vegetal, dentre elas, pectinases, lipases,  $\alpha$ -amilases, proteases e celulases, com o objetivo de propiciar seu uso em diversos setores da indústria é crescente nos últimos anos. Além de aplicações industriais diretas das enzimas vegetais, é importante detectar e avaliar a atividade destas, pois em alguns casos a presença de determinadas enzimas ativas é indesejável. Sabe-se que a tendência de escurecimento dos tecidos vegetais está relacionada com as reações entre as enzimas polifenoloxidase ou peroxidase e os substratos naturais presentes nesses tecidos. Este processo e mais a oxidação promovida pelo oxigênio do ar são os responsáveis pelo decréscimo da atividade enzimática nos extratos brutos.

As lipases estão entre os mais importantes biocatalisadores, capazes de atuar em reações em meio aquoso e orgânico. É o terceiro maior grupo de enzimas no mercado mundial, atrás apenas das proteases e carboidrases. Estão presentes em tecido animal e vegetal e podem ser produzidas por diversos micro-organismos. Sua principal função é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácido graxo, mas podem atuar também em reações de síntese de ésteres e transesterificação (Vakhlu, 2006).

A descoberta de novas atividades lipolíticas é de grande interesse científico e tecnológico devido ao amplo potencial de aplicações em reações de síntese em diferentes áreas da indústria biotecnológica. As lipases apresentam comportamento catalítico versátil, podendo atuar na síntese de ingredientes para a indústria de alimentos, farmacêutica, agroquímica, de biocombustíveis,

aromas e têxtil (Su et al., 2010; Vakhlu, 2006).

Lipases de origem vegetal são bastante atrativas em razão de seu baixo custo, alta disponibilidade e facilidade de purificação. O uso de lipases a partir de fontes vegetais deve estar relacionado à sua viabilidade, ou seja, é de interesse encontrar matérias-primas fonte de lipase que possam ser usadas também em outras áreas da indústria (Villeneuve, 2003).

Dentre as carboidrases, a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) pode ser encontrada em fontes vegetais, principalmente em sementes amiláceas durante a germinação. São bastante aplicadas na indústria de alimentos, em processos de fermentação e hidrólise de amido.

Neste estudo foi feita uma prospecção enzimática no fruto da palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd Ex Mart, conhecido, dentre outros termos, por macaúba. É um fruto rico em lipídios, proteínas e fibras. É comestível, de sabor adocicado e aroma pronunciado, sendo frequentemente consumido *in natura* ou na forma de sorvetes, sucos, geléia ou farinha (Ramos et al., 2007; Hiane et al., 2005; Silva et al., 2009). Atualmente, esse fruto tem sido estudado devido ao seu uso ainda incipiente, porém com inúmeras possibilidades de aplicações nas indústrias bioquímica e de alimentos (Nogueira et al., 2010; Silva et al., 2009; Hiane et al., 2005).

## 2.2 Material e métodos

As amostras de frutos de *Acrocomia aculeata* foram coletadas no município de Ponta Porã - MS. A coleta foi feita com os frutos que já estavam no solo, em condições semelhantes de maturação, casca amarelo-esverdeada, firmes e de aparência intacta. Os frutos foram descascados, despulpados em despulpadeira específica para esta fruta, produzida pela Universidade Federal de Viçosa e fornecida para a comunidade local pantaneira, e o endosperma quebrado em prensa hidráulica para obtenção da amêndoa. As frações polpa e amêndoa permaneceram estocadas, separadamente, em ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante a realização das análises, que compreenderam a prospecção de diversas enzimas na amêndoa e polpa do fruto: lipase, esterase, protease,  $\alpha$ -amilase, celulase, pectinase, polifenoloxidase, peroxidase, fitase e tanase.

### 2.2.1 Obtenção do extrato enzimático bruto para prospecção enzimática

Para obtenção dos extratos enzimáticos brutos, a polpa e amêndoa foram homogeneizadas separadamente em liquidificador durante 3 minutos, com soluções tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e tampão fosfato 0,05M pH 7,0. Após homogeneização, as soluções foram filtradas em gaze e centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos a  $10000 \times g$ . O precipitado, que continha fragmentos insolúveis, foi descartado e o sobrenadante, extrato enzimático bruto, conge-

lado a  $-18^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

## **2.2.2 Determinação da atividade enzimática**

Os extratos enzimáticos brutos (2.2.1) foram utilizados para medida das atividades das seguintes enzimas: lipase, esterase, protease,  $\alpha$ -amilase, celulase, pectinase, polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD), tanase e fitase.

### **2.2.2.1 Atividade de lipase**

A atividade enzimática da lipase, com óleo de oliva como substrato, foi determinada utilizando-se meio reacional composto por 5 ml de emulsão preparada com 25% de óleo de oliva e 75% de solução de goma arábica 7%, e 2 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 a 0,1 M, Após 10 minutos de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  para equalizar a temperatura, adicionou-se a esta solução 1 ml do extrato enzimático, seguindo-se incubação em banho a  $37^{\circ}\text{C}$  com agitação. A reação foi paralisada através da adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05 M, utilizando-se fenolftaleína 0,5% como indicador. O “branco” foi preparado de forma idêntica, substituindo-se a solução enzimática por água destilada. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação nas condições do teste (Macedo, 1995).

### **2.2.2.2 Atividade de esterase**

A atividade esterásica foi determinada utilizando 1 mL do substrato triacetina, 7 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e 1 mL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados titulados com solução de KOH 0,05 M usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de ácido acético por minuto, nas condições descritas (Barros e Macedo, 2011).

### **2.2.2.3 Atividade de protease**

A atividade de protease foi medida utilizando-se caseína como substrato. Uma alíquota de 5 mL de solução de 1,2% de caseína pH 6,0 foi transferida para tubos de ensaio incubados a 35 °C por 10 minutos para equilibrar a temperatura. A estes adicionou-se 1 mL da solução enzimática e seguiu-se a incubação por exatamente 10 minutos. A reação foi paralisada com 5 mL de ácido tricloroacético 5% e filtrada em papel Whatman no. 42 após 20 minutos de repouso em banho de gelo. A absorbância foi medida a 280 nm. Foi preparado um branco para cada amostra seguindo-se o mesmo procedimento

para o preparo da amostra, porém com a solução de ácido tricloroacético 5% adicionada antes da enzima. O substrato caseína foi preparado adicionando-se 50 mL de NaOH 0,05 N a 1,2 g de caseína e agitando-se até completa dissolução. A solução foi ajustada para pH 6,0 com ácido fosfórico 0,1 M e o volume completado para 100 mL. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado por minuto de reação (Macedo, 1995).

#### **2.2.2.4 Atividade de $\alpha$ -amilase**

A determinação qualitativa de  $\alpha$ -amilase foi baseada no método de SKB (Sandsted, Kneen & Blish), citado por Sato (1991) modificado por Taffarello (2004). O método se baseia na alteração da propriedade de coloração do amido com iodo durante a hidrólise com  $\alpha$ -amilase. A coloração da mistura de reação com reagente de iodo é comparada à coloração da solução padrão de  $\text{CoCl}_2$  e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em meio ácido.

Tubos de ensaio contendo 20 mL de solução 2% de amido solúvel em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 9 mL de água destilada foram incubados a 30 °C por 10 minutos para equalizar a temperatura. Em seguida, 1 mL da solução enzimática foi adicionada e seguiu-se incubação a 30°C por 30 minutos. Após este período, uma amostra de 1 mL foi retirada da mistura reacional e adicionada a 5 mL de solução diluída de iodo-KI. A coloração obtida dessa

reação foi comparada visualmente a uma solução padrão, indicando presença ou ausência da enzima  $\alpha$ -amilase.

A solução diluída de iodo-iodeto de potássio ( $I_2$ -KI) foi preparada a partir da mistura de 2 mL de solução estoque (5,5 g de  $I_2$  e 11 g de KI em 250 mL de água destilada) e 20 g de KI dissolvido em 500 mL de água destilada. A solução padrão é constituída de 25 g de  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$  e 3,84 g de  $K_2Cr_2O_7$  em 100 mL de HCl 0,01 N.

#### **2.2.2.5 Atividade de celulase**

Tubos de ensaio contendo 4 mL de solução 0,5% de substrato carboximetilcelulose em tampão citrato fosfato 0,05M pH 5,0 foram incubados em banho-maria a 40°C por 10 minutos para equalizar a temperatura. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução enzimática na concentração adequada. O “branco” foi preparado adicionando-se 1 mL de água no lugar da solução enzimática. Seguiu-se a incubação por mais 20 min. Para paralisar a reação os tubos foram imersos em banho de gelo. Em seguida, foi feita a determinação dos açúcares redutores formados pelo método de Somogyi-Nelson. Uma unidade de atividade de celulase foi definida como a quantidade, em  $\mu g$  de açúcar redutor formado / minuto / mL de extrato enzimático (Bhat, 1997; Macedo et al., 2005).

### *Determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson*

Foi adicionado 0,5 mL de amostra em tubo de ensaio contendo 1 mL de reagente SNI, após agitação a mistura foi incubada em banho-maria em ebulição por 6 min, sendo, em seguida, paralisada em banho de gelo. Adicionou-se 1 mL de reagente SNII e, após agitação permaneceu em repouso por 5 min. Foram adicionados 10 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm contra o “branco” (Somogy, 1952).

#### **2.2.2.6 Atividade de pectinase**

Incubou-se uma mistura de 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5mL de solução de pectina cítrica 0,1% em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 a 40°C por 20 min. A reação foi interrompida pela inativação enzimática por 10 min em banho em ebulição. O “branco” foi preparado de forma idêntica, substituindo-se a solução enzimática por água destilada, e o controle, também preparado da mesma forma, apenas substituindo a solução enzimática por solução de enzima previamente inativada em banho em ebulição por 10 minutos (Rizzatto, 2004; Macedo et al., 2005).

A quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, foi realizada pelo método de Somogy-Nelson. A atividade de pectinase foi calculada pela diferença entre as concentrações dos grupos redutores presentes nas amostras e nos respectivos controles. Uma unidade de atividade de

pectinase foi definida como a quantidade, em  $\mu\text{g}$  de açúcar redutor formado / minuto / mL de extrato enzimático.

#### **2.2.2.7 Atividade de polifenoloxidase**

A atividade de polifenoloxidase (PPO) nos extratos do fruto foi determinada de acordo com o método descrito por Oktay et al. (1995) e Lima (1999). A mistura reacional foi composta de 0,1 mL de extrato enzimático na diluição adequada, 1,2 mL de substrato catecol 0,4% (ou 0,01 M) em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 e 1,7 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. O “branco” foi preparado misturando-se 1,8 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 e 1,2 mL de substrato catecol 0,4% (ou 0,01 M) em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. A reação iniciou-se com a adição do extrato enzimático e a leitura foi feita registrando-se as alterações na absorbância em intervalos de 30 segundos durante 5 minutos a 420 nm. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como a quantidade da enzima que ocasiona um aumento na absorbância de 0,001 / min/ g de amostra.

#### **2.2.2.8 Atividade de peroxidase**

A atividade de peroxidase foi medida através da metodologia de Khan e Robinson (1994). A mistura reacional foi constituída de 0,1 mL de solução enzimática na diluição apropriada, 1,5 mL de solução de guaiacol 1% em tam-

pão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e 0,4 mL de peróxido de hidrogênio 0,1 M diluído no tampão de análise adicionado de 1,2 mL do tampão de análise até completar 3,2 mL de mistura final. A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático e a leitura feita registrando-se as alterações na absorbância em intervalos de 30 segundos durante 5 minutos a 470 nm. Uma unidade de atividade de peroxidase (PPO) foi definida como a quantidade da enzima que ocasiona um aumento na absorbância de 0,001 / min/ g de amostra. O branco foi preparado substituindo-se a solução de peróxido de hidrogênio por tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 (Holschuh, 2000).

#### **2.2.2.9 Atividade de fitase**

A atividade de fitase em fitato de sódio foi determinada como descrito por Shimizu (1992). A mistura de 600  $\mu$ L de solução 2 mM de fitato de sódio em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 contendo 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 150  $\mu$ L de solução enzimática foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37 °C. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 750  $\mu$ L de solução 5% ácido tricloroacético (TCA). À mistura de reação foi adicionado 1,5 mL do reagente de cor composto por 4 volumes de 1,5% molibdato de amônio em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,5% e 1 volume de solução 2,7% de sulfato ferroso. O P<sub>i</sub> liberado foi determinado fotometricamente a 700 nm em espectrofotômetro Beckman DU640. O curso da reação é acompanhado por uma curva padrão de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

### 2.2.2.10 Atividade de tanase

A atividade da enzima tanase foi determinada como descrita por Mondal et al. (2001). A mistura de 0,3 mL de solução de ácido tânico (MERCK) 0,7% (p/v) em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,5 mL de solução enzimática na diluição adequada foi incubada a 60 °C por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) preparada em tampão acetato 0,2 M pH 5,0, contendo 0,17 M de cloreto de sódio. A mistura foi em seguida centrifugada a 10000 x *g* por 15 minutos a temperatura de 4 °C. O precipitado contendo o ácido tânico que a enzima não hidrolisou foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionado de 5% (v/v) de trietanolamina em água destilada) acrescido de 1 mL de solução 0,01 M de FeCl<sub>3</sub> em 0,01 M de ácido clorídrico. Este meio reacional foi dissolvido em 20 mL de água destilada. Após 15 minutos de repouso procedeu-se a medida da absorbância a 530 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640). A atividade enzimática foi calculada através de uma curva de calibração preparada com ácido tânico. O tubo “controle” foi preparado utilizando-se a enzima desnaturada por 10 minutos em banho em ebulição. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade em  $\mu\text{mol}$  do substrato hidrolisado durante 1 minuto de reação por mL de extrato enzimático.

### **2.2.3 Determinação da concentração protéica**

O método proposto por (Bradford, 1976) para medir o teor de proteína é simples, rápido e bastante sensível, além de ser pouco susceptível à interferência de reagentes e compostos não protéicos encontrados em biomoléculas. O reagente de Bradford foi preparado pela solubilização de 100 mg do corante azul de Coomassie em 50 mL de etanol 95%. Esta solução é então misturada a 100 mL de ácido fosfórico 85% e completada com água destilada até atingir o volume de 1 L. O reagente foi filtrado em papel Whatman no.1 e estocado em frasco âmbar. Em um tubo de ensaio pipetou-se 1 ml do reagente de Bradford adicionado de 100  $\mu$ L do extrato enzimático na diluição adequada. A absorvância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro. A leitura foi feita entre 2 e 60 minutos após a adição do extrato enzimático, como recomendado. O tubo branco foi preparado com água destilada no lugar do reagente de Bradford, e a curva padrão com albumina bovina em diferentes diluições entre 10 e 100  $\mu$ g/ml (Kruger, 1996).

## **2.3 Resultados e discussão**

O resultado dos testes realizados a fim de se investigar a presença de algumas enzimas em polpa e amêndoa de macaúba está relatado, qualitativamente,

Tabela 2.1: Atividade enzimática do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba.

Presença (+) ou ausência (-) de atividade enzimática		
Enzima	Amêndoa	Polpa
Lipase	+	+
Esterase	+	-
Protease	-	-
$\alpha$ -amilase	-	-
Celulase	+	+
Pectinase	+	+
Polifenoloxidase	+	+
Peroxidase	+	+
Fitase	-	-
Tanase	-	-

na Tabela 2.1. Polpa e amêndoa de macaúba não apresentaram atividade para as enzimas protease,  $\alpha$ -amilase, tanase e fitase. A enzima esterase foi encontrada apenas na amêndoa do fruto.

O teor de proteína extraído da amêndoa é cerca de 10 vezes maior que o extraído da polpa (Tabela 2.2). A atividade enzimática e atividade enzimática específica para cada enzima analisada nas diferentes frações da fruta e métodos de extração são mostradas nas Tabelas 2.3 e 2.4, onde é possível observar que a atividade enzimática foi mais expressiva na polpa.

### 2.3.1 Atividade de lipase

Polpa e amêndoa de macaúba mostraram ser uma fonte relevante de lipase. O extrato bruto da polpa de macaúba obtido com tampão fosfato 0,1 M pH 5,0 apresentou atividade de lipase de 33 U/g de polpa, e atividade específica

Tabela 2.2: Teor de proteína do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão.

	Proteína (mg/ml)	Proteína (mg/g)*
<b>Extrato bruto pH 5,0</b>		
Amêndoa	5,6±0,3	31±2
Polpa	0,82±0,09	3,5±0,4
<b>Extrato bruto pH 7,0</b>		
Amêndoa	6,8±0,5	38±3
Polpa	0,84±0,09	3,6±0,4

*Médias ± desvio padrão de 3 valores. \* Valores expressos em relação à massa de fração de fruta fresca*

Tabela 2.3: Atividade enzimática do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão.

Atividade Enzimática (U/g)	Lipase	Esterase	Pectinase	Celulase	POD	PPO
<b>Extrato bruto pH 5,0</b>						
Amêndoa	41±3	14±1	207±2	64±5	1501±151	61±3
Polpa	33±3	0,3±0,1	1977±121	440±22	2941±132	135±1
<b>Extrato bruto pH 7,0</b>						
Amêndoa	25±1	9,8±0,5	219±11	66±4	558±64	58±1
Polpa	27±1	0,3±0,1	2455±49	554 ±38	1810±35	158±1

*Médias ± desvio padrão de 3 valores. Resultados expressos por massa de fração de fruta fresca. POD: peroxidase; PPO: polifenoloxidase.*

Tabela 2.4: Atividade enzimática específica do extrato bruto das frações polpa e amêndoa de macaúba extraídas com diferentes soluções tampão.

Atividade Enzimática Específica (U/mg de proteína)	Lipase	Esterase	Pectinase	Celulase	POD	PPO
<b>Extrato bruto pH 5,0</b>						
Amêndoa	1,4±0,1	2,6±0,2	6,9±0,1	2,1±0,2	50±5	2,0±0,1
Polpa	9,9±0,9	0,1±0,1	66±4	126±6	844±37	38,7±0,2
<b>Extrato bruto pH 7,0</b>						
Amêndoa	0,68±0,04	0,27±0,01	7,2±0,4	1,8±0,1	15±2	1,6±0,1
Polpa	8,1±0,3	0,1±0,1	81±2	155±11	507±9	44,2±0,4

*Médias ± desvio padrão de 3 valores. Resultados expressos por massa de fração de fruta fresca. POD: peroxidase; PPO: polifenoloxidase.*

de 9,9 U/mg de proteína, valor maior que o encontrado em látex de mamão formosa, com atividade específica de 125 U/g (Paques e Macedo, 2006) e menor que o encontrado por Panzanaro et al. (2010) em lipase de óleo de oliva, aproximadamente 80 U/mg de proteína.

Caro et al. (2000) mediram a atividade de lipase em extratos brutos de papaína, bromelina e látex de *E. characias* encontrando valores de 55 U/g, 42 U/g e 129 U/g, respectivamente, utilizando trioleína como substrato. Ao utilizar tributirina como substrato foram obtidos maiores valores de atividade de lipase, sendo observado os valores de 1590 U/g, 64 U/g e 10295 U/g para os extratos brutos de papaína, bromelina e látex de *E. characias*, respectivamente. Cambon et al. (2008) estudaram as características da lipase do fruto *Carica pentagona* que apresenta atividade lipolítica de 275 U/g de látex em óleo de oliva. A semente de mamona é considerada, por sua alta atividade, uma das principais fontes de lipase de origem vegetal. Su et al. (2010) verificaram que a preparação bruta de lipase se semente de mamona apresentou 20,1 U/mg de proteína, utilizando-se substrato óleo de oliva. Em lipase extraída do mesocarpo de palma foi encontrada atividade específica de 33 U/mg de proteína e 190 U/g de polpa (Ebongue et al., 2006).

A presença de lipase na macaúba, principalmente no mesocarpo, representa uma possibilidade de exploração deste fruto para emprego em processos biotecnológicos. Há uma série de aplicações nas quais a lipase extraída da polpa de macaúba poderia atuar, como na hidrólise de óleos para síntese de

ésteres, glicerol e ácidos graxos, síntese de ésteres a partir de álcoois primários e síntese de aromas. Por esta razão, a caracterização e o estudo das possibilidades de aplicação desta enzima são de grande interesse.

### **2.3.2 Atividade de pectinase**

A atividade de pectinase da polpa da macaúba também pode ser considerada de grande relevância. Neste trabalho foi encontrada atividade pectinolítica de 2455 U/g de polpa de macaúba. Wilkins et al. (2007) encontraram uma atividade de 233 IU/mg de proteína para a enzima comercial Pectinex Ultra SP. A enzima comercial Prozyn Pectizyn 10 apresentou atividade de 9044,4 mg de glicose/g de enzima. Thé et al. (2001) encontraram atividade de 402,24 U/g em abacaxi Smooth Cayenne.

### **2.3.3 Atividade de peroxidase**

Há diversos estudos que relatam a atividade de peroxidase em frutas, e mostram que há uma grande variação de atividade dentre os diferentes frutos. Abacaxi pérola apresenta alta atividade de peroxidase, com valores de 5624 U/g (Brito et al., 2007) e 6480 U/g (Antoniolli et al., 2003). Azevedo (2006) encontrou atividade de 7422 U/mL no extrato bruto em manga Tommy Atkins. Foi encontrada atividade de 2293 U/g em polpa de maçã Fuji (Valderama et al., 2001). A polpa de macaúba apresentou atividade de peroxidase

de 2941 U/g de polpa fresca extraída em pH 5,0. Figo e morango apresentam baixa atividade de peroxidase, 25 U/g e 0,314 U/mL (Civello et al., 1995), respectivamente. Fatibello-Filho e Vieira (2002) estudaram extratos brutos vegetais como fonte de peroxidase. Dentre os vegetais estudados a abobrinha foi considerada o de maior atividade enzimática (13727 U/mg de proteína), o rabanete apresentou atividade específica de 10245 U/mg, a atividade de peroxidase em batata doce foi de 2707 U/mg e do extrato bruto de pêsego de 107 U/mg de proteína. A atividade específica de peroxidase encontrada para a polpa de macaúba foi de 844 U/mg de proteína em extrato em pH 5,0.

#### **2.3.4 Atividade de polifenoloxidase**

Amêndoa e polpa de macaúba também apresentaram atividade de polifenoloxidase, sendo que na polpa esta atividade é mais elevada, com um total de 158 U/g de polpa fresca. Foi obtido atividade de polifenoloxidase igual a 44,2 U/mg de proteína em polpa de macaúba extraída em pH de 7,0. Valderrama et al. (2001) encontraram atividade de polifenoloxidase de 124,4 U/g em maçã Fuji. Azevedo (2006) reportou atividade de 57,3 U/mL em manga Tommy Atkins madura. Polpa de pinha madura apresentou atividade específica de 17,75 U/mg (Lima, 1999).

A polifenoloxidase é responsável pelo escurecimento enzimático de muitos vegetais e frutas quando cortados e expostos ao ar. Este escurecimento é cau-

sado pela ação dessa enzima sobre os compostos fenólicos naturais e o oxigênio atmosférico que são oxidados a o-quinona, que em seguida pode se polimerizar e formar as melaninas. Nos tecidos vegetais, a enzima polifenoloxidase está localizada nos cloroplastos e sua concentração (atividade) no tecido vegetal depende do local do plantio, período da colheita, espécie e do estado de amadurecimento deste, sendo menor em frutos ou vegetais não-amadurecidos (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

A atividade de enzimas que causam escurecimento foi alta em polpa de macaúba, principalmente a polifenoloxidase. Este fato deve ser considerado durante o processamento do fruto com o objetivo de evitar o escurecimento de sua polpa.

## 2.4 Conclusões

O extrato bruto da polpa do fruto da palmeira *Acrocomia aculeata* apresentou valores de atividade catalítica expressivos para lipase, celulase e pectinase, que são enzimas de grande interesse comercial. A atividade catalítica de enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase, foi bastante relevante, sendo de grande importância sua inativação prévia durante o processamento do fruto. Lipases de origem vegetal, apesar de menos estudadas que as de origem microbiana ou animal, devem ser consideradas como fonte potencial em reações de biocatálise. Os dados obtidos revelam a presença de lipase em polpa de

macaúba, indicando a viabilidade de um estudo que permita caracterizar esta enzima e investigar suas possíveis aplicações.

## Referências Bibliográficas

Antoniolli, L. R.; Benedetti, B. C.; Souza, F. M. (2003). Effect of calcium chloride on quality of fresh-cut “Pérola” pineapple. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:41–45.

Azevedo, A. (2006). *Estudo das enzimas oxidativas e presença de compostos bioativos em mangas (Mangifera indica L.) produzidas no Brasil*. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 168p.

Barros, M.; Macedo, G. A. (2011). Biochemical characterization of esterase from soybean (*Glycine max L.*). *Food Science and Biotechnology*, 20(5):1195–1201.

Bhat, M. K. B. S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15:583–620.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.

Brito, C. A. K.; Sato, H. H.; Spinorello, A.; Siqueira, W. J. (2007). Abacaxi

- IAC gomo-de-mel (*Ananas comosus* (L.) Merrill): características da polpa e da peroxidase do suco. *Boletim Ceppa*, 25:257–266.
- Cambon, E.; Rodriguez, J. A.; Pina, M.; Arondel, V.; Carriere, F.; Turon, F.; Ruales, J.; Villeneuve, P. (2008). Characterization of type - and regio - and and stereo-selectivities of babaco latex lipase in aqueous and organic media. *Biotechnology Letters*, 30:769–774.
- Caro, Y.; Villeneuve, P.; Pina, M.; Reynes, M.; Graille, J. (2000). Lipase Activity and Fatty acid Typoselectivities of Plant Extracts in Hydrolysis and Interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77:350–356.
- Civello, P. M.; Martínéz, G. A.; Chaves, A. R.; Afión, M. C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *Journal of Agriculte and Food Chemistry*, 43:2593–2601.
- Ebongue, G. F. N.; Dhouib, R.; Carrière, F.; Zollo, P. H. A.; Arondel, V. (2006). Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:611–617.
- Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. (2002). Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, 25:455–464.
- Hiane, P. A.; Ramos, M. M.; Ramos, M. I. L.; Macedo, M. L. R. (2005).

- Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(3):256–259.
- Holschuh, H. J. (2000). Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Tese de Doutorado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP*, 159p.
- Khan, A. A.; Robinson, D. S. (1994). Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chemistry*, 49(4):407–410.
- Kruger, M. J. (1996). *The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook*. Humana Press Inc.
- Lima, E. D. P. A. (1999). Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família anonácea pinha (*Annona squamosa* L.). Tese de Doutorado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP*, 132p.
- Lorenzi, G. M. A. C. (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - *Areaceae: Bases para o extrativismo sustentável*. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 172p.
- Macedo, G.; Pastore, G.; Sato, H.; Park, Y. (2005). *Bioquímica experimental de alimentos*. Ed. Varela.

- Macedo, G. A. (1995). Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *geotrichum sp.* Dissertação de Mestrado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP*, 121p.
- Mondal, K.; Banerjee, D.; Jana, M.; Pati, B. (2001). Colorimetric assay Method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Analytical Biochemistry*, 295:168–171.
- Nogueira, B. M.; Carretonia, C.; Cruza, R.; Freitas, S.; Jr., P. A. M.; Costa-Félix, R.; Pinto, J. C.; Nele, M. (2010). Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67:117–121.
- Oktay, M.; Kufrevioglu, I.; Kocacaliskan, I.; Sakiroglu, H. (1995). Polyphenoloxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60(3):494–505.
- Panzanaro, S.; Nutricati, E.; Miceli, A.; Bellis, L. D. (2010). Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea L.*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:741–745.
- Paques, F. W.; Macedo, G. A. (2006). Lipase de látex vegetais: propriedade e aplicações industriais. *Química Nova*, 29(1):93–99.
- Ramos, M. I. L.; Siqueira, E. M. A.; Isomura, C. C.; Barbosa, A. M. J.; Arruda, S. F. (2007). Bocaiuva (*Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd*) Impro-

- ved Vitamin A Status in Rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55:3186–3190.
- Rizzatto, M. (2004). *Estudo da produção de pectinases em reator de coluna por fermentação semi-sólida de bagaço de laranja*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- Sato, H. H. (1991). *Estudo das características bioquímicas da pululanase de Klebsiella sp e sua aplicação*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas - Campinas - SP.
- Shimizu, M. (1992). Purification and characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56:1266–1269.
- Silva, B. P.; Silva, G. M.; Parente, J. P. (2009). Chemical properties and adjuvant activity of a galactoglucomannan from *Acrocomia aculeata*. *Carbohydrate Polymers*, 75:380–384.
- Somogy, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195:19–23.
- Su, E. Z.; Zhou, Y.; You, P. Y.; Wei, D. Z. (2010). Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. *J Shanghai Univ (Engl Ed)*, 14(2):137–144.

- Taffarello, L. A. B. (2004). Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias. Dissertação de Mestrado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP*, 183p.
- Thé, P.; de Carvalho, V.; de Abreu, C.; Nunes, R.; N.A.V.D.Pinto (2001). Modificações na atividade enzimática em abacaxi Smooth Cayenne em função da temperatura de armazenamento e do estágio de maturação. *Ciência Agrotecnológica*, 25:364–370.
- Vakhlu, J. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1):69–85.
- Valderrama, P.; Marangoni, F.; Clemente, E. (2001). efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21:321–325.
- Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science Technology*, 105:308–317.
- Wilkins, M. R.; Widmer, W. W.; Grohmann, K.; Cameron, R. G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98:1596–1601.



## Capítulo 3

# Caracterização bioquímica da lipase de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

### 3.1 Introdução

As enzimas estão intimamente relacionadas com os processos de biotransformação, que são modificações específicas ou interconversões de estruturas químicas e, dentre os processos biológicos utilizados nas biotransformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese. São biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Seu potencial de aplicação é significativo, principalmente, devido à sua capacidade de utilização em uma grande diversidade de substratos, à sua estabilidade a temperatura, pH e solventes orgânicos, e à sua quimio-regio e enantiosseletividade. Entre as lipases, aquelas obtidas de

vegetais são interessantes por sua facilidade de obtenção, abundância e pouca exploração (Villeneuve, 2003).

O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria, apresentam perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas, que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários (Lorenzi, 2006).

Neste contexto, as lipases são enzimas bastante comuns em fontes vegetais, principalmente sementes e grãos, e também em polpa de frutos ricos em lipídios. Tem potencial de aplicação significativo, sendo de grande relevância nas áreas agroalimentar e farmacêutica, nas indústrias de detergentes e cosméticos, além de sua importância na produção de biocombustíveis. Assim, é de grande interesse científico e comercial o conhecimento das propriedades que caracterizam novas enzimas produzidas a partir de fontes vegetais, principalmente a partir de subprodutos da indústria ou de espécies da flora brasileira ainda pouco aproveitadas.

## **3.2 Material e métodos**

As amostras de macaúba foram coletadas no município de Ponta Porã - MS. A coleta foi feita com os frutos que já estavam no solo, em condições semelhantes de maturação, casca amarelo-esverdeada, firmes e de aparência

intacta. Os frutos foram descascados e despulpados, para a utilização da polpa na produção do extrato enzimático bruto. Foi feito um estudo da extração da lipase da polpa de macaúba, a fim de otimizar a metodologia e, em seguida, o extrato enzimático liofilizado de polpa de macaúba foi submetido às análises tradicionais para caracterização da lipase: determinação da temperatura e pH ótimo de atividade e de estabilidade, efeito da adição de sais, inibidores, ativadores, surfactantes, estabilidade em solventes orgânicos, especificidade enzimática em substratos sintéticos e naturais e determinação de parâmetros termodinâmicos. Foi feito também o estudo de possíveis aplicações da enzima em reações de hidrólise e esterificação.

### **3.2.1 Obtenção do extrato enzimático bruto de lipase de macaúba**

Para obtenção do extrato enzimático bruto, a polpa de macaúba foi homogeneizada em liquidificador durante 3 minutos, com soluções tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0, citrato-fosfato pH 6,0 e tampão fosfato 0,05M pH 7,0. Após homogeneização as soluções foram filtradas em gaze e centrifugadas a 4 °C durante 30 minutos a 10000 x *g*. O extrato enzimático preparado com a solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 foi preparado novamente com a adição de diferentes substâncias, separadamente: ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 0,05 M, cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,01 M, cisteína 0,002 M e uma mistura de EDTA e CaCl<sub>2</sub>. O extrato enzimático, obtido em condições

otimizadas, a partir da adição de solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0, ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 0,05 M e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M à polpa de macaúba, foi liofilizado por 48 horas (liofilizador Liotop L101) e congelado a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  para uso durante as análises de caracterização.

### **3.2.2 Semipurificação do extrato enzimático bruto de lipase de macaúba**

O processo de semipurificação do extrato enzimático bruto, obtido a partir da adição de solução tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0, ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 0,05 M e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M à polpa de macaúba, foi feito através da precipitação com acetona e fracionamento pela adição de diferentes concentrações de sulfato de amônio.

#### **3.2.2.1 Precipitação com acetona**

Ao extrato enzimático bruto (3.2.1) foi adicionada acetona a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  na concentração de 80% sob agitação lenta e constante. A mistura foi mantida em banho de gelo por 1 hora para a precipitação total das proteínas. O precipitado formado foi separado por centrifugação a  $10000\text{ x }g$  durante 30 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . O excesso de acetona foi removido por evaporação à pressão ambiente. O extrato obtido foi homogeneizado em almofariz e conservado a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  protegido da luz e umidade.

### **3.2.2.2 Fracionamento com sulfato de amônio**

Foi adicionado ao extrato enzimático bruto (3.2.1) sulfato de amônio até as concentrações de 20, 40, 60 e 80%(p/v) sob agitação lenta e constante a 5 °C. A mistura permaneceu por 10 horas a 4°C, para total precipitação das proteínas. Após o período de decantação, a mistura foi centrifugada a 10.000 x *g* por 40 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em pequenas quantidades de solução de 0,001 M de CaCl<sub>2</sub> e dialisado também contra solução de 0,001 M de CaCl<sub>2</sub>, até total eliminação do sulfato de amônio. Ao término da diálise, o extrato obtido foi liofilizado e conservado em local protegido da luz e da umidade à temperatura de -18°C.

### **3.2.3 Determinação da atividade lipolítica por titulação**

A atividade enzimática da lipase, com azeite de oliva como substrato, foi determinada no extrato enzimático bruto (3.2.1) utilizando-se meio reacional composto por 5 mL de emulsão preparada com 25% de óleo de oliva e 75% de solução de goma arábica 7%, e 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, Após 10 minutos de incubação a 37°C, para equalisar a temperatura, adiciona-se a esta solução 1 mL do extrato enzimático, seguindo-se incubação em banho a 37°C com agitação de 180 oscilações por minuto. A reação foi paralisada através da adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1).

Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05 M, utilizando-se fenolftaleína 0,5% como indicador. O “branco” foi preparado de forma idêntica substituindo-se a solução enzimática por água destilada. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação nas condições do teste (Macedo, 1995).

### **3.2.4 Determinação da atividade lipolítica por espectrofotometria**

A atividade lipolítica do extrato bruto e extrato bruto liofilizado de sementes de macaúba foi determinada espectrofotometricamente pela hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato pNPB. Foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  da solução enzimática a 3,430 mL de uma solução contendo: 1,12 mM de *p*NP éster, tampão fosfato pH 7,0 50 mM, Triton X-100 0,2% (v/v) e tetrahydrofurano 0,43 M. As leituras foram feitas após 5, 10 e 15 minutos de reação a 405 nm. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado (em  $\mu\text{mol}$ ) por minuto por mL do sobrenadante, sob as condições especificadas.

### **3.2.5 Determinação da concentração protéica**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina como padrão (Kruger, 1996).

### **3.2.6 Caracterização enzimática da lipase de macaúba**

A lipase extraída da polpa de macaúba foi submetida a ensaios para determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade, temperatura ótima de atividade e de estabilidade, efeito da adição de sais, ativadores, inibidores e surfactantes na atividade enzimática, estabilidade em solventes orgânicos e estudo de sua especificidade em diferentes substratos.

#### **3.2.6.1 Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade da lipase de macaúba**

A determinação do pH ótimo foi efetuada empregando os tampões acetato 0,1 M na faixa de pH 3,6 a 5,5; tampão fosfato 0,1 M entre pH 6,0 e 7,0; tampão Tris-HCl na faixa de pH 7,0 a 9,0. A estabilidade da enzima em relação ao pH foi estudada a partir da medida da atividade das soluções enzimáticas deixadas em repouso por 24 horas a 30 °C preparadas nos diferentes sistemas tamponantes especificados acima. A medida da atividade enzimática foi realizada de acordo com a Seção 3.2.3.

### **3.2.6.2 Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade da lipase de macaúba**

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com a Seção 3.2.3 utilizando-se diferentes temperaturas de incubação entre 30 e 90 °C. Para a determinação da estabilidade térmica da enzima, as soluções foram submetidas a tratamentos térmicos na mesma faixa de temperatura durante 1 hora, sendo, em seguida, submetidas à determinação de sua atividade lipolítica.

### **3.2.6.3 Efeito de sais na atividade da lipase de macaúba**

A influência de sais na atividade enzimática foi verificada nas concentrações de 1 e 10 mM . Foi utilizado o sistema de reação descrito em 3.2.3 com adição dos seguintes sais: CaCl<sub>2</sub>, KCl, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaHSO<sub>3</sub>.

### **3.2.6.4 Efeito de ativadores, inibidores e surfactantes na atividade da lipase de macaúba**

O efeito de compostos ativadores ou inibidores da lipase foi verificado de forma semelhante ao efeito de sais na atividade enzimática. Os compostos utilizados neste teste foram: EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), uréia, ácido ascórbico, citrato de sódio, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol e PMSF (fenil metil sulfonyl fluoreto) nas concentrações de 1 e 10 mM. Foi verificada tam-

bém a atividade lipásica na presença de surfactantes, como polietileno glicol de diferentes massas moleculares (PEG400, PEG6000 e PEG20000), CTAB (brometo de cetil trimetil amônio), SDS (dodecil-sulfato de sódio), Triton X-100 e Tween 80.

### 3.2.6.5 Estabilidade da lipase de macaúba em solventes orgânicos

A síntese de compostos de interesse utilizando lipases, muitas vezes é mais efetiva em meio orgânico. A estabilidade da enzima em solventes orgânicos foi testada a partir da incubação da enzima em cada solvente a 30 °C por 1 hora. Após secagem do solvente com nitrogênio líquido, a enzima foi submetida à reação para determinação da atividade enzimática residual como descrito na Seção 3.2.3.

A Tabela 3.1 lista os solventes utilizados, em ordem decrescente de polaridade, definidas por sua constante dielétrica e também pelo valor  $E_T$ , que corresponde à energia de transição para a banda de absorção de maior comprimento de onda do corante betaina (2) piridinium-N-fenóxido dissolvido, medido em kcal . mol<sup>-1</sup>, a partir da Equação 3.1.

$$E_T = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_a = 2,859 \times 10^{-3} \cdot \nu \quad (3.1)$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $c$  é a velocidade da luz,  $\nu$  é o comprimento de onda correspondente a transição, expresso em cm<sup>-1</sup>, e  $N_a$  é o número de

Avogrado.

Tabela 3.1: Constante dielétrica e  $E_T$  dos solventes testados na estabilidade da lipase de macaúba.

Solvente	Constante dielétrica	$E_T$ Kcal/mol
Água	80,1	63,1
Metanol	32,7	55,4
Etanol	24,5	51,9
Propanol	20,0	48,4
Butanol	18,0	47,1
Acetona	20,7	42,2
Acetato de etila	6,0	38,9
Hexano	1,9	31,0

Fonte: (Reichardt, 1994)

### 3.2.6.6 Especificidade da lipase de macaúba

A especificidade da lipase foi estudada utilizando-se substratos naturais e sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica. Foram usados triacetina, tributirina, tricaproína, tripalmitina e trioleína e, dentre os substratos sintéticos, *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), *p*-nitrofenil caprilato (*p*-NPC), *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP).

### 3.2.7 Determinação da atividade de hidrólise de óleos e gorduras

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1mL de suspensão enzimática na concentração de 100 mg/mL, 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; e 1 g de óleo de soja, girassol, milho, palma, oliva, canola, linhaça, babaçu ou manteiga. Os frascos foram incubados a 30 °C em banho termostaticado sob agitação. Foi preparado um sistema de reação para cada um dos seguintes tempos: 1 h, 2 h, 6 h, 12 h e 24 h. As amostras foram tituladas contra NaOH 0,05 M. A porcentagem de hidrólise foi calculada pela equação 3.2.

$$\% \text{Hidrólise} = \frac{\mu\text{mol de ácido graxo liberado} \cdot 100}{I_S \cdot \left(\frac{1000}{56,1}\right) \cdot m}, \quad (3.2)$$

em que:

$m$  = massa (g) do óleo ou gordura utilizada;

$I_S$  = Índice de saponificação

Índice de saponificação corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio requerido para neutralizar os ácidos e saponificar os ésteres de 1,0 g de óleo ou gordura. Indica a capacidade de formação de sais de ácidos graxos da amostra, em meio alcalino e a quente (Macedo, 1995).

### 3.2.8 Atividade de esterificação da lipase de macaúba

As reações de esterificação com o extrato enzimático de lipase semipurificado e liofilizado, foram realizadas em tubos de vidro cilíndricos de 10 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro com duas tampas: uma interna, do tipo selo, e outra externa com rosca. Os sistemas de reação são compostos por 0,1 g de ácido e 7,5 mL de álcool, 10 pérolas de vidro e extrato enzimático semipurificado numa proporção de 2,5% (m:m) com relação a massa total do sistema. Para isso foram utilizados os ácidos com diferentes tamanhos de cadeia, oléico, esteárico, palmítico, láurico, caprílico e butírico em reação com 2-butanol. Para cada combinação, foi determinada a porcentagem de esterificação em meio livre de solvente e água. Aos sistemas previamente equilibrados a 30 °C foi adicionado o extrato enzimático. As reações foram realizadas a 30 °C com agitação de 130 rpm após 10, 24 e 48 h. Para cada um dos sistemas foi preparado um ensaio que representou as condições do sistema sem a presença da enzima, e um tubo “branco”, sem enzima para verificação da taxa de esterificação química (espontânea) do sistema nas condições descritas.

A análise das porcentagens de esterificação, nestes ensaios, foi feita através de titulação do ácido residual do sistema após 10, 24 e 48 horas de reação, utilizando NaOH 0,05 M e fenolftaleína 0,5% em etanol para observação do ponto de viragem. A porcentagem de esterificação foi calculada considerando 100% de ácido graxo livre no tempo zero de reação, e subtraindo a porcentagem residual de ácido livre (Macedo, 1995).

### 3.2.9 Termoestabilidade enzimática da lipase de macaúba: determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos

Tubos de ensaio contendo 7 mL de solução do extrato enzimático bruto da lipase extraída da polpa de macaúba foram incubados a 30, 35, 40, 50 e 60 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas aos 30, 60, 90, 120 e 240 minutos para as temperaturas de 30, 35 e 40 °C; e 10, 20, 30, 60 e 90 minutos para as temperaturas de 50 e 60 °C, sendo imediatamente resfriadas em banho de gelo por 3 minutos. Em seguida, foi determinada a atividade residual de lipase usando o método descrito na Seção 3.2.3. Considerou-se a atividade da lipase sem tratamento térmico como 100% e a atividade residual relativa da enzima foi calculada como apresentado na equação 3.3, onde  $A$  é a atividade relativa de lipase (%);  $U_t$  equivale à média das atividades de lipase em cada tempo de acompanhamento e  $U_0$  equivale à média das atividades de lipase sem tratamento térmico ( $t = 0$  min).

$$A = (U_t/U_0) \times 100 \quad (3.3)$$

Os parâmetros cinéticos  $K_d$ ,  $t_{1/2}$ , valor  $D$ , valor  $Z$ , e os parâmetros termodinâmicos  $E_{ad}$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  e  $\Delta S$ , foram determinados a partir dos valores de atividade residual obtidos através da equação 3.3, ajustados graficamente em modelos de curvas teóricas para verificar o perfil da cinética de desnaturação

enzimática da lipase de polpa de macaúba (Barros e Macedo, 2011).

### 3.2.9.1 Constante de desnaturação ( $K_d$ )

Considerando-se para esta enzima um modelo de cinética de desnaturação enzimática de primeira ordem, pode-se escrever a equação 3.4, onde  $r_d$  corresponde a taxa de desnaturação ( $U/t$ ),  $U_t$  é a atividade enzimática em um determinado momento,  $t$  é o tempo em minutos e  $K_d$  é a taxa constante de desnaturação para cada temperatura.

$$-r_d = -dU_t/dt = K_d \cdot U_t \quad (3.4)$$

Por integração da equação 3.4 obtém-se a equação 3.5, onde  $U_t$  corresponde a atividade enzimática após um período de tempo  $t$  e  $U_o$  é a atividade enzimática inicial sem tratamento térmico.

$$U_t = U_o \exp(-K_d \cdot t) \quad (3.5)$$

Assim, os logaritmos naturais de  $U_t/U_o$  obtidos ao longo do acompanhamento do estudo da termoestabilidade da lipase, foram plotados em função do tempo para o cálculo de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ). O valor da inclinação da reta de regressão linear dos dados experimentais foi considerado como sendo a constante de desnaturação ( $K_d$ ) na temperatura avaliada.

### 3.2.9.2 Meia-vida ( $t_{1/2}$ )

Corresponde ao intervalo de tempo necessário, em uma temperatura determinada, para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial. Este parâmetro foi determinado a partir de  $K_d$  utilizando a equação 3.6.

$$t_{1/2} = -\ln(0,5)/K_d \quad (3.6)$$

### 3.2.9.3 Valor de redução decimal (valor $D$ )

O valor  $D$  corresponde ao tempo necessário em minutos para reduzir a velocidade de reação a 10% do valor inicial. Este parâmetro foi calculado a partir da equação 3.7.

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (3.7)$$

### 3.2.9.4 Valor $Z$

Este parâmetro indica a variação de temperatura requerida em um sistema para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico na velocidade de reação, ou seja, perda de 90% da atividade enzimática. O valor  $Z$  foi determinado graficamente pelo inverso da inclinação da reta obtida a partir da relação gráfica de  $\log(D) \times temperatura$ .

### 3.2.9.5 Energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ )

Considerando-se que a perda de atividade enzimática devido a desnaturação ocorre segundo uma taxa constante ( $K_d$ ) nas diferentes temperaturas, é possível estimar a energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ ). A energia requerida para promover a ativação da desnaturação pode ser determinada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de Arrhenius (equação 3.8), onde  $k$  corresponde a velocidade de reação,  $E_a$  a energia de ativação aparente,  $R$  a constante universal dos gases ( $8,314 J mol^{-1} K^{-1}$ ) e  $T$  a temperatura absoluta ( $K$ ).

$$\ln k = -E_a/RT + \ln K_d \quad (3.8)$$

Assim, a energia requerida para promover a ativação da desnaturação pode ser determinada pela inclinação da reta ( $-E_a/R$ ) obtida a partir da linearização proposta por Arrhenius na forma de  $\ln(K_d) \cdot 1/T$ .

### 3.2.9.6 Entalpia ( $\Delta H$ )

A entalpia de desnaturação refere-se à quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima. Este parâmetro foi calculado para cada temperatura a partir da equação 3.9.

$$\Delta H = E_{ad} - R.T \quad (3.9)$$

### 3.2.9.7 Energia livre ( $\Delta G$ )

Os valores de energia livre da inativação nas diferentes temperaturas foram calculados a partir da constante do processo de inativação, conforme a equação 3.10, onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,6262 \cdot 10^{-34} J.s$ ) e  $KB$  é a constante de Boltzmann ( $1,3806 \times 10^{-23} J.K^{-1}$ ).

$$\Delta G = -R.T.\ln(Kd \cdot h/(KB \cdot T)) \quad (3.10)$$

### 3.2.9.8 Entropia ( $\Delta S$ )

A entropia de desnaturação é a quantidade de energia por grau de temperatura envolvida na transição do estado nativo para o estado desnaturado. Este parâmetro foi calculado a partir da equação 3.11.

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (3.11)$$

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Estudo da extração da lipase de polpa de macaúba

Na primeira etapa foram realizados ensaios com diferentes sistemas tampão, citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0, citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e tampão fosfato 0,05 M pH 7,0; a fim de se determinar o melhor pH para extração da lipase em polpa de macaúba. A concentração de proteína variou de 3,6 a 5,2 mg/g de polpa, e o extrato preparado com tampão fosfato 0,05 M pH 7,0

apresentou o maior rendimento de extração (Figure 3.1). A maior atividade específica (14,7 U mg<sup>-1</sup> de proteína), no entanto, foi conseguida com a lipase extraída com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 (Figure 3.2).

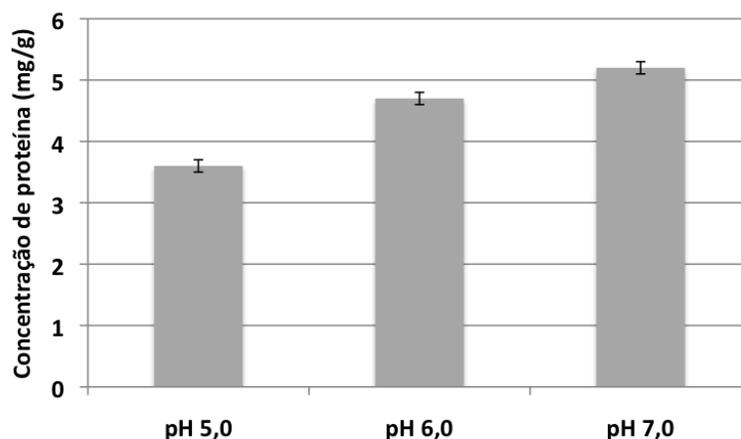


Figura 3.1: Teor de proteína dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com diferentes soluções tampão, expresso em mg proteína/g de polpa de macaúba.

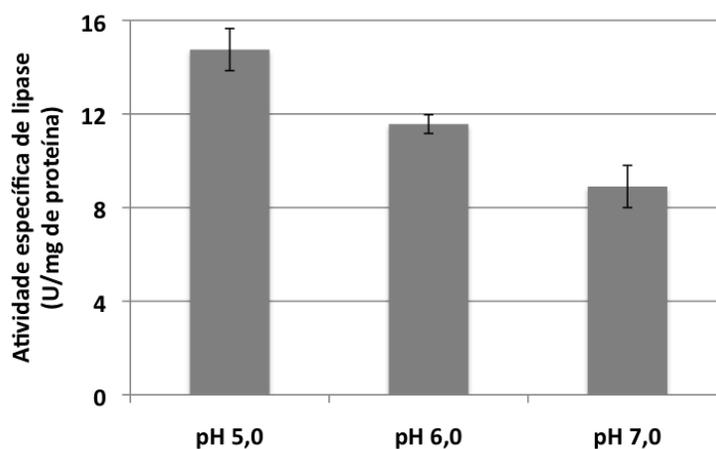


Figura 3.2: Atividade específica de lipase dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com diferentes soluções tampão, expressa em U/mg de proteína.

A partir deste resultado foi feita a extração da enzima em solução tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 com diferentes aditivos, EDTA 0,05 M, CaCl<sub>2</sub>

0,01 M, cisteína 0,002 M e uma mistura de EDTA e  $\text{CaCl}_2$ ; com o objetivo de investigar seus efeitos durante o processo de extração da lipase.

A presença de EDTA e  $\text{CaCl}_2$  resultou em perda de rendimento da quantidade de proteína extraída, enquanto que a adição de cisteína aumentou a concentração proteica para 3,8 mg/g de polpa (Figura 3.3). Todos os aditivos empregados neste estudo contribuíram para o aumento da atividade enzimática quando comparado ao extrato preparado somente com a solução tampão. A presença de EDTA, acrescido ou não de cloreto de cálcio, aumentou em até duas vezes a atividade da lipase (Figura 3.4).

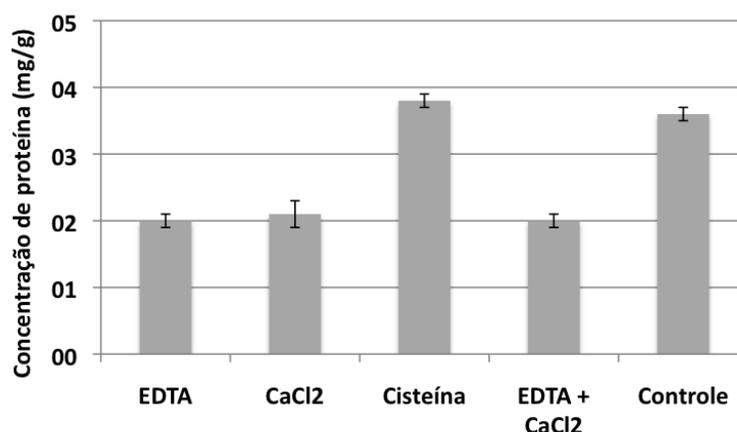


Figura 3.3: Teor de proteína dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 com diferentes aditivos, expresso em mg proteína/g de polpa de macaúba. Controle: extraído com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 sem utilização de aditivos.

Os valores obtidos para atividade da lipase de polpa de macaúba são compatíveis com as atividades de outras lipases de origem vegetal. Villeneuve (2003) reportou atividades de lipase de 42 e 55 U/g de extrato bruto de bro-

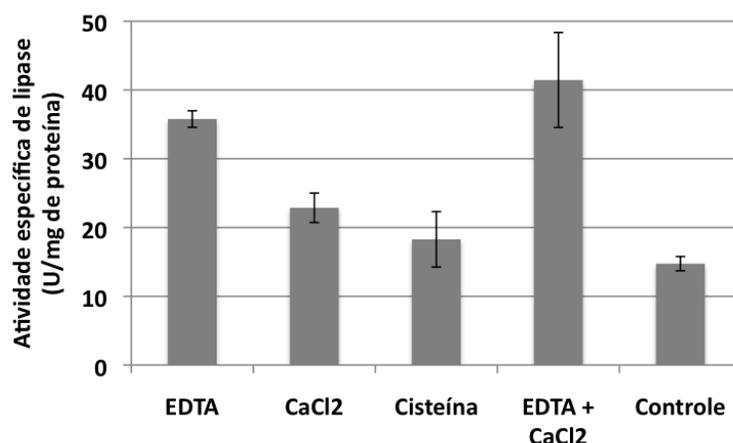


Figura 3.4: Atividade específica de lipase dos extratos enzimáticos de polpa de macaúba extraídos com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 com diferentes aditivos, expressa em U/mg de proteína. Controle: extraído com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 sem utilização de aditivos.

melina e papaína, respectivamente. A atividade da lipase em mesocarpo de azeitona foi determinada por Panzanaro et al. (2010) em diferentes estádios de amadurecimento, sendo a máxima atividade encontrada no valor de 80  $\mu\text{mol}$  de ácido oléico/min/mg de proteína. Neste estudo Panzanaro et al. (2010) também observaram que a adição de cálcio no meio reacional provocava um aumento na atividade da lipase.

A lipase da semente de mamona foi estudada por Su et al. (2010), que encontraram atividade específica de 20,1 U/mg de proteína e por Eastmond (2004) também estudou as propriedades da lipase de semente de mamona e observou um pequeno aumento da atividade a partir da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio reacional e uma pequena inibição da atividade na presença de EDTA. A adição de cisteína, apesar de aumentar o teor de proteína extraída causou um

decréscimo na atividade específica da lipase da polpa de macaúba. A mesma situação foi observada por Kapranchkov et al. (2004) em um estudo sobre lipase isolada de gérmen de trigo extraída com diferentes soluções, que encontraram maior atividade na enzima extraída com solução tampão contendo EDTA.

O extrato obtido com solução tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 contendo EDTA 0,05 M e  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, que apresentou a maior valor de atividade específica, foi purificado parcialmente por precipitação com acetona e por fracionamento com sulfato de amônio utilizando diferentes concentrações. (Tabela 3.2).

A semipurificação, independente da fonte enzimática, tem por objetivo concentrar o conteúdo de proteínas, favorecendo o aumento da atividade enzimática e, conseqüentemente, facilitar o estudo de suas propriedades. A precipitação é uma forma simples de concentração da enzima que pode ser efetuada por adição de sais, solventes orgânicos, soluções de polímeros ou por alteração do pH (Freire e Castilho, 2008). Há vários estudos que relatam o emprego de sais de sulfato de amônio e solventes orgânicos para concentração de enzimas lipolíticas de origem vegetal (Yesiloglu e Baskurt, 2008; Sagiroglu e Arabaci, 2005; Sana et al., 2004; Abigor et al., 2002). No entanto, solventes orgânicos podem, em alguns casos, levar à inativação enzimática.

A precipitação com sulfato de amônio baseia-se na teoria do “salting-out”, onde é adicionada ao extrato de interesse uma grande quantidade de sal,

Tabela 3.2: Atividade da lipase da polpa de macaúba durante o processo de semipurificação.

Etapas de semipurificação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	185±7	6593±793	36± 3	1	100
Acetona	61±1	637±58	10±1	0,29	33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20%	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40%	33± 1	121±1	3,7±0,2	0,10	18
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60%	42±1	200±70	5±1	0,13	23
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80%	49±2	391±47	8±1	0,23	26

*Médias ± desvio padrão de 3 valores.*

deixando o meio com elevada força iônica. Dessa forma, as moléculas de água interagem mais fortemente com íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desidratação das proteínas. Durante esse processo, as forças de interação entre as proteínas se tornam mais fortes, diminuindo a solubilidade da mesma em meio aquoso e propiciando sua precipitação (Barros e Macedo, 2011).

O rendimento de lipase obtido a partir da precipitação em acetona ou sulfato de amônio em qualquer concentração final foi baixo, e a atividade específica foi menor nos extratos semipurificados através de precipitação em sulfato de amônio.

### 3.3.2 Caracterização enzimática

A lipase extraída da polpa de macaúba apresentou atividade máxima a 40 °C (Figura 3.5), e permaneceu estável na faixa de temperatura entre 25 e 40 °C (Figura3.6). Em temperaturas superiores a 40 °C a estabilidade da enzima

decreceu em mais de 50%.

Lipase de germen de trigo apresentou temperatura ótima de 37 °C, e instabilidade em temperaturas superiores a 40 °C, permanecendo com aproximadamente 20% de sua atividade inicial em temperaturas elevadas (Kapranckov et al., 2004). Lipases de mamona se mostraram bastante estáveis em temperaturas entre 30 e 70 °C (Su et al., 2010).

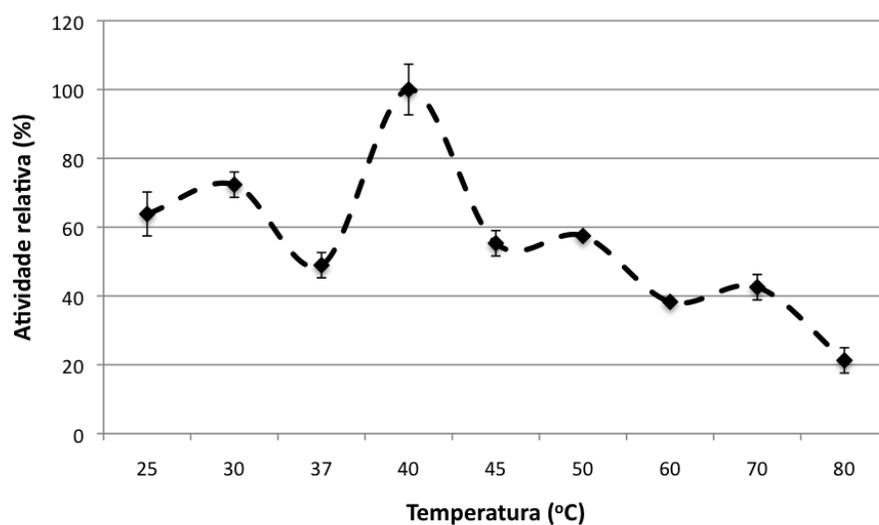


Figura 3.5: Temperatura ótima de atividade de lipase da polpa de macaúba.

A lipase de macaúba apresentou atividade ótima em pH 5,5 (Figura 3.7) e maior estabilidade na faixa de pH 5,5 e 7,0 (Figura 3.8). Dentre as lipases de origem vegetal, a lipase da semente de mamona é a mais estudada, com diversos trabalhos sobre sua caracterização, purificação e aplicações (Ory et al., 1962; Eastmond, 2004; Su et al., 2010). A lipase da mamona tem duas isoenzimas, sendo que uma delas tem alta atividade na semente não germinada, e apresenta atividade ótima em pH 4,2. A lipase de polpa de macaúba tam-

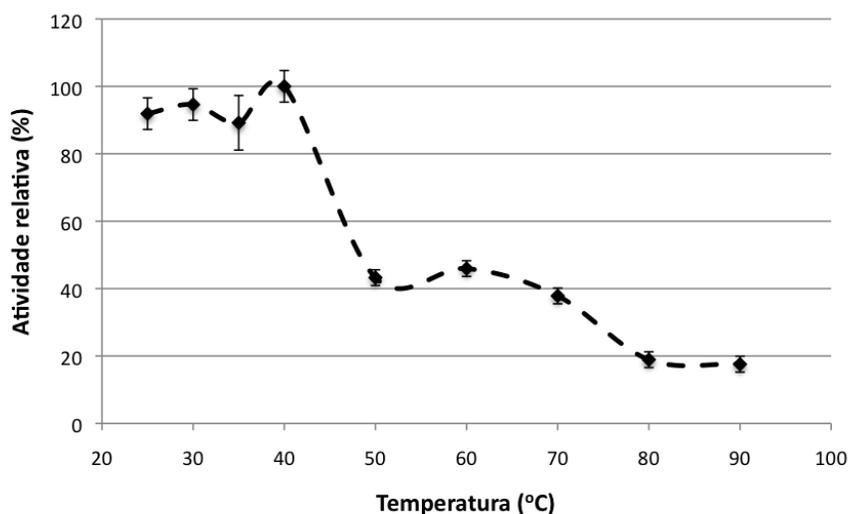


Figura 3.6: Efeito da temperatura na estabilidade da lipase em polpa de macaúba.

bém apresenta atividade ótima em pH ácido. Outras lipases vegetais também tem pH ótimo de atividade ácido, como a lipase extraída do mesocarpo de azeitona, com pH ótimo de 5,0 (Panzanaro et al., 2010).

O estudo da atividade enzimática na presença de diferentes sais, mostra que a lipase extraída da polpa de macaúba foi inibida pela ação de  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{HgCl}_2$ . Sais contendo os íons  $\text{K}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  exerceram leve inibição sobre a atividade da lipase. A enzima foi levemente ativada na presença de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaHSO}_4$  (Figura 3.9). Lipase extraída da mamona foi inibida na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , e ativada na presença de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Su et al., 2010). Em estudo realizado com lipase extraída da polpa de azeitona, Panzanaro et al. (2010) verificaram que a atividade da enzima permanece praticamente inalterada em tratamentos com diferentes íons, uma vez que todos os sais testados produzem alterações pouco relevantes na atividade da

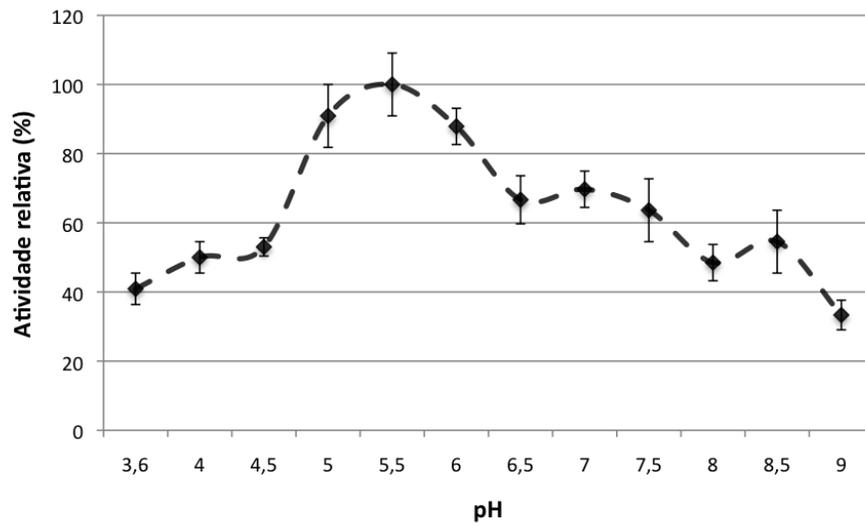


Figura 3.7: pH ótimo de atividade de lipase da polpa de macaúba.

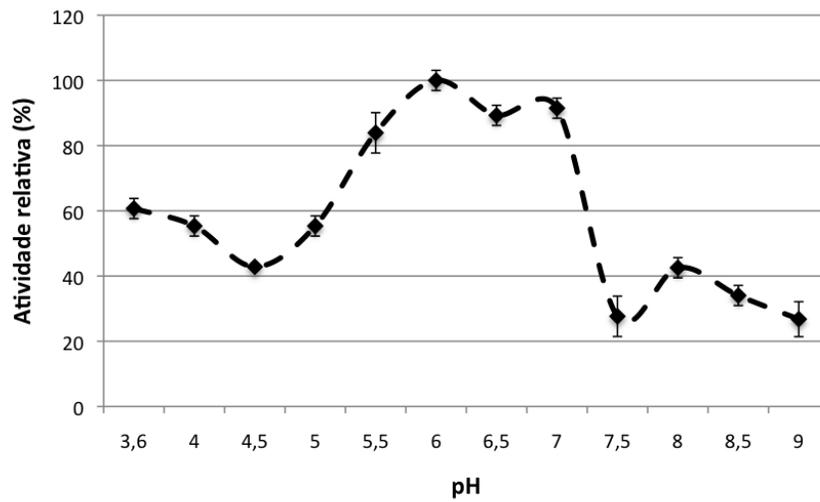


Figura 3.8: Efeito do pH na estabilidade da lipase da polpa de macaúba.

enzima, com exceção de  $\text{CuCl}_2$ .

A inibição provocada por íons  $\text{Hg}^{2+}$  sugere a presença de cisteína no sítio ativo da enzima, pois este reage com grupos sulfidríla. A lipase apresentou uma inibição relevante na presença de 10 mM de  $\text{HgCl}_2$ , e redução de apenas 20% de sua atividade relativa em concentração de 1,0 mM do sal. Outros estudos que também sugeriram a presença de serina no sítio ativo apresentaram maior grau de inibição, onde concentrações menores que 1 mM de  $\text{HgCl}_2$  reduziram a 17% a atividade de lipase em mamona e inibição integral da atividade em lipase de amendoim (Eastmond, 2004; Panzanaro et al., 2010).

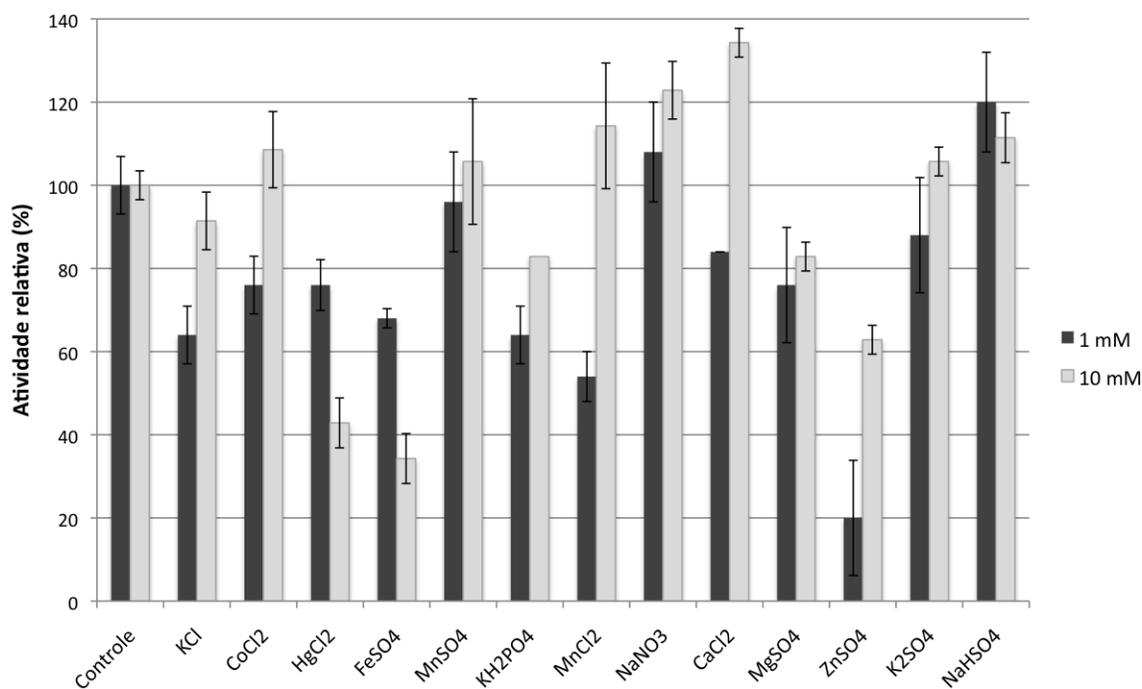


Figura 3.9: Efeito de diferentes sais na atividade da lipase da polpa de macaúba.

A Figura 3.10 mostra o efeito de diferentes substâncias na atividade da enzima. Citrato de sódio, cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol inibem a enzima mode-

radamente. Nota-se que a lipase é levemente ativada na presença de PMSF e ácido ascórbico. Assim como em lipases de semente de mamona e de óleo de oliva, a lipase de macaúba apresenta leve inibição, de 20% do valor da atividade controle, na presença de 10 mM de EDTA, enquanto estudos realizados em lipases de palma e milho apresentaram inibição total (Panzanaro et al., 2010; Eastmond, 2004). A inibição causada por EDTA depende da força de interação no complexo formado entre o composto EDTA e cátions divalentes possivelmente presentes no sítio ativos de enzimas, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , entre outros (Whitaker, 1994).

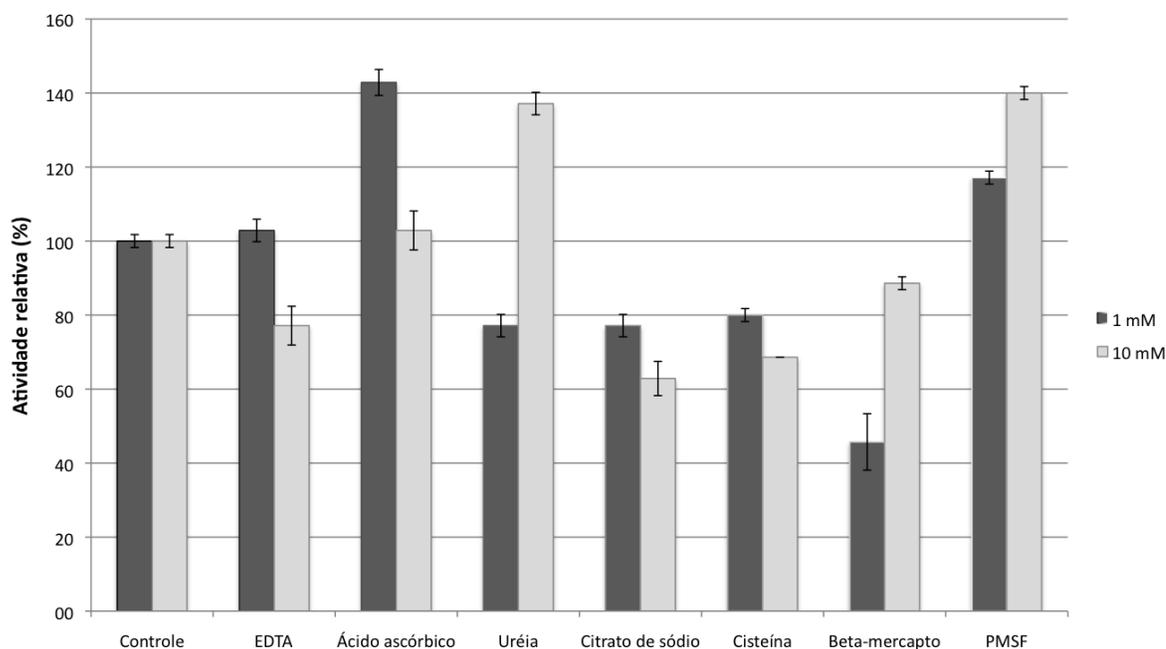


Figura 3.10: Efeito de ativadores e inibidores na atividade da lipase em polpa de macaúba.

Os agentes tensoativos ou surfactantes são moléculas compostas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. As moléculas tensoativas em

solução aquosa podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da concentração e características da solução. A ligação de surfactantes a proteínas é influenciada por algumas variáveis tais como, a natureza e o comprimento da cadeia do surfactante, pH, força iônica, temperatura e a natureza da proteína (Polizelli, 2008).

Neste estudo, a maioria dos surfactantes estudados não provocou alteração relevante na atividade da lipase de macaúba. (Figura 3.11). SDS, um surfactante aniônico, ativou a enzima em cerca de 30% na concentração de 10 mM, resultado que contradiz os resultados obtidos por outros estudos com lipases e esterases. Lipase de *Pachira aquatica* é inibida por SDS, perdendo até 10% de sua atividade em concentrações até 10 mM e até 60% de sua atividade inicial em concentrações de 50 mM (Polizelli, 2008). Com esterase de soja, apesar da adição de SDS em baixas concentrações, de 1 e 5 mM, aumentar a atividade em mais de 100%, concentrações maiores de 10 mM inibem completamente a atividade da enzima (Barros e Macedo, 2011).

O surfactante catiônico testado foi o CTAB, que causou leve inibição na lipase de macaúba. Polizelli (2008) reporta moderada ativação de lipase de *Pachira aquatica* em qualquer concentração de CTAB, e Barros e Macedo (2011) observaram inibição em esterase de soja em concentração de 10 mM. Os surfactantes não-iônicos, Tween-80 e Triton-X-100, causaram leve inibição da enzima em ambas as concentrações testadas. Barros e Macedo (2011) e Polizelli (2008) também observaram decréscimo na atividade das enzimas esterase

de soja e lipase de *Pachira aquatica* na presença de surfactantes não-iônicos, porém em maior grau, chegando a mais de 50% de inibição na concentração de 10 mM.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético, solúvel em água, atóxico, muito utilizado em biotecnologia. A influência de moléculas de PEG na atividade catalítica de algumas enzimas foi verificada em alguns estudos reportados na literatura. A atividade de fosfofrutoquinase e da gliceraldeído 1,3 bifostato desidrogenase é 1,3 e 1,55 vezes maior na presença de PEG. Esse efeito pode ser atribuído à hidrofobicidade das enzimas, à atividade de água, à exclusão estérica ou ao estresse osmótico (Polizelli, 2008). Estudos da interação de PEG e lisozima mostraram que independentemente da massa molecular não ocorreu influência na atividade da enzima. A atividade de uma enzima está relacionada ao seu sítio catalítico e à sua estrutura; assim, dependendo da estrutura e sítio ativo de uma enzima pode ocorrer o aumento ou diminuição da atividade na presença de PEG. Dessa forma, predizer o efeito de PEG no comportamento das enzimas de forma generalizada é bastante complicado (Pancera, 2006).

O tratamento de lipase de polpa de macaúba com polietilenoglicol causou uma ativação da enzima com PEG de determinadas massas moleculares e concentrações. PEG de maior massa molecular foi capaz de ativar a enzima em 30% na concentração de 10 mM, porém causou inibição de cerca de 20% na concentração de 1 mM. Em contrapartida, na presença de PEG de menor

massa molecular, 0,4 kDa, a enzima foi levemente inibida quando se usou solução a 10 mM e foi ativada em solução de 1 mM. Polizelli (2008) observou ativação da lipase de *Pachira aquatica* em tratamento com PEG de diferentes massas moleculares e concentrações, sendo a ativação máxima na presença do PEG de maior massa molecular testada.

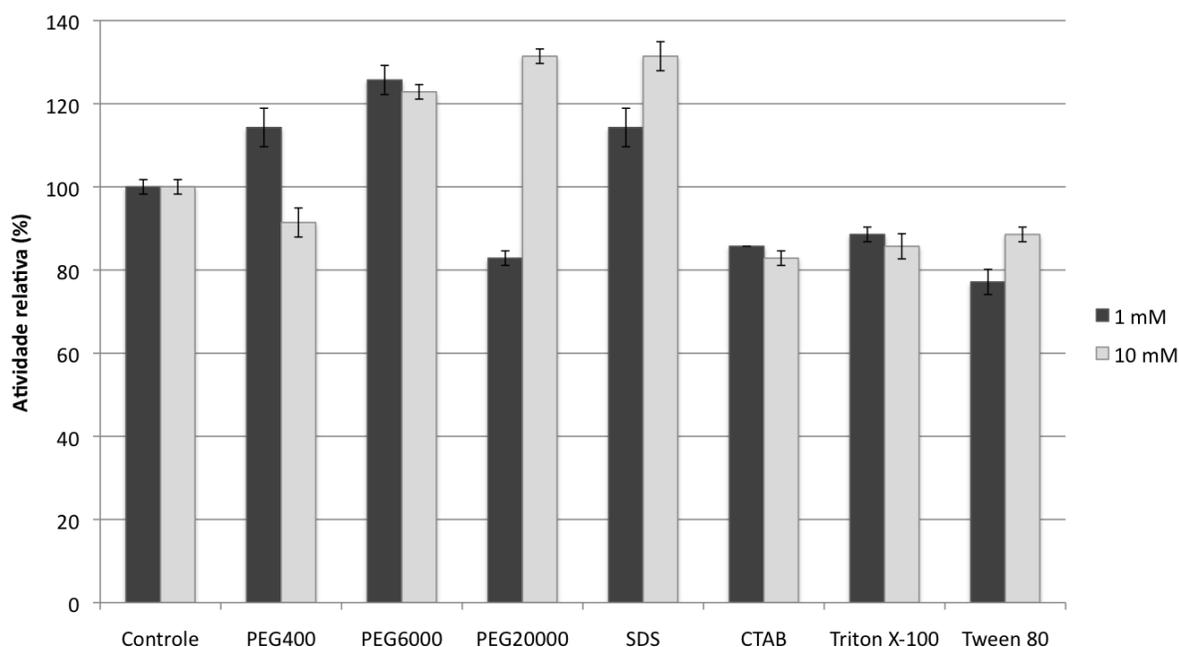


Figura 3.11: Efeito de diferentes surfactantes na atividade da lipase em polpa de macaúba.

A lipase extraída da polpa de macaúba é relativamente estável na presença de solventes orgânicos. O único solvente capaz de ativar a enzima foi o hexano, único solvente apolar empregado neste estudo. No entanto, é possível perceber também que os solventes não causam uma inibição relevante, já que a atividade após tratamento com estes solventes foi pelo menos de 60% do valor de atividade da enzima sem tratamento. A inibição da atividade enzi-

mática foi maior para solventes de maior polaridade, como etanol e metanol, e também para o acetato de etila (Figura 3.12).

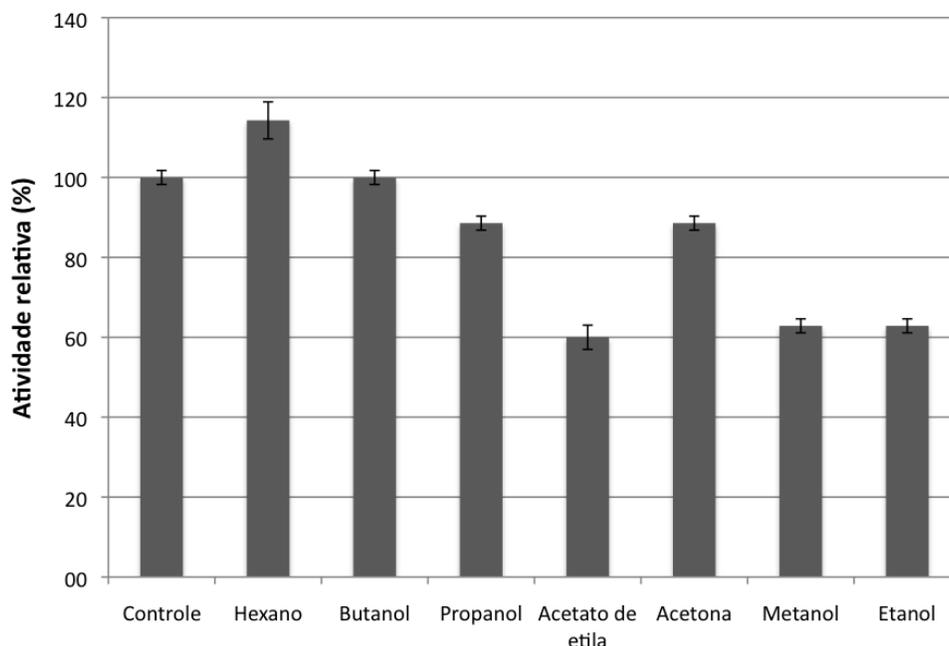


Figura 3.12: Efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade da lipase da polpa de macaúba.

Os testes para especificidade mostram que a enzima é verdadeiramente uma lipase, visto que apresenta maior atividade em ácidos graxos com cadeias carbônicas médias e longas (Figuras 3.13 e 3.14), característica que as diferenciam de esterases. Embora as esterases sejam enzimas lipolíticas, elas apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia carbônica curta, menor que 6 carbonos (Lopes et al., 2011). Segundo Hellyer et al. (1999), as lipases vegetais apresentam seletividade para o ácido graxo dominante na semente. De fato, a lipase de macaúba apresentou maior afinidade pelos triacilgliceróis constituídos de ácido oléico e palmítico, que representam, respectivamente, 66

e 16% do total de ácidos graxos da polpa do fruto (Hiane et al., 2005; Coimbra e Jorge, 2012). Observou-se novamente que a lipase da polpa de macaúba apresentou baixa atividade em ácidos graxos de cadeia curta. Sua atividade relativa foi de aproximadamente 40% para *p*-NPB e *p*-NPC e de 20% para *p*-NPA, mostrando mais uma vez que a lipase em questão é específica para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. Dentre os óleos e gorduras testados, o óleo de oliva foi o substrato sobre o qual a lipase apresentou a maior atividade relativa, seguido do óleo de palma, que contém majoritariamente os ácidos graxos oléico e palmítico (Figura 3.15).

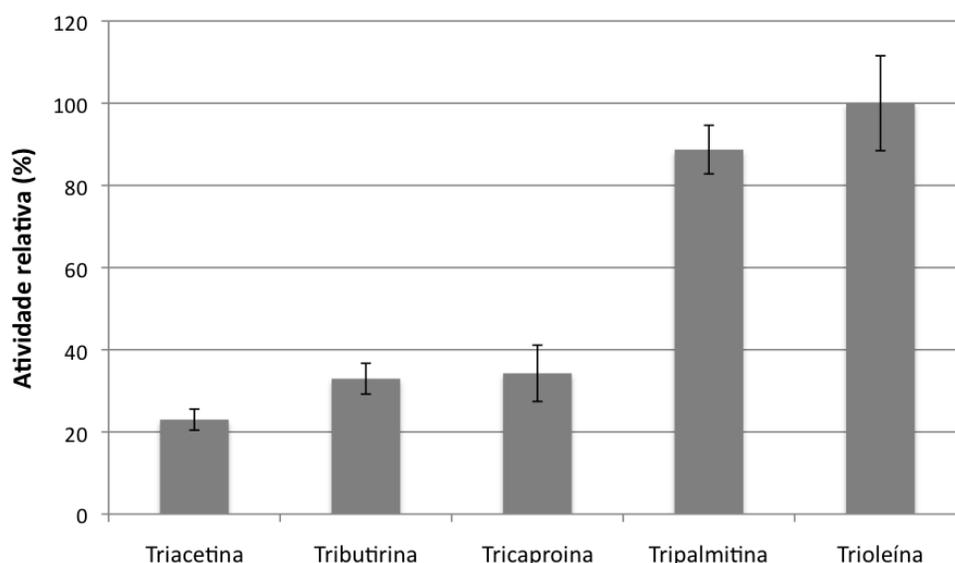


Figura 3.13: Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes substratos naturais.

A definição usada para a lipase, em que se diz que lipase é uma enzima capaz de hidrolisar triacilgliceróis se tornou insuficiente frente às possibilidades de aplicação biotecnológica desta enzima. Vorderwulbeck et al. (1992)

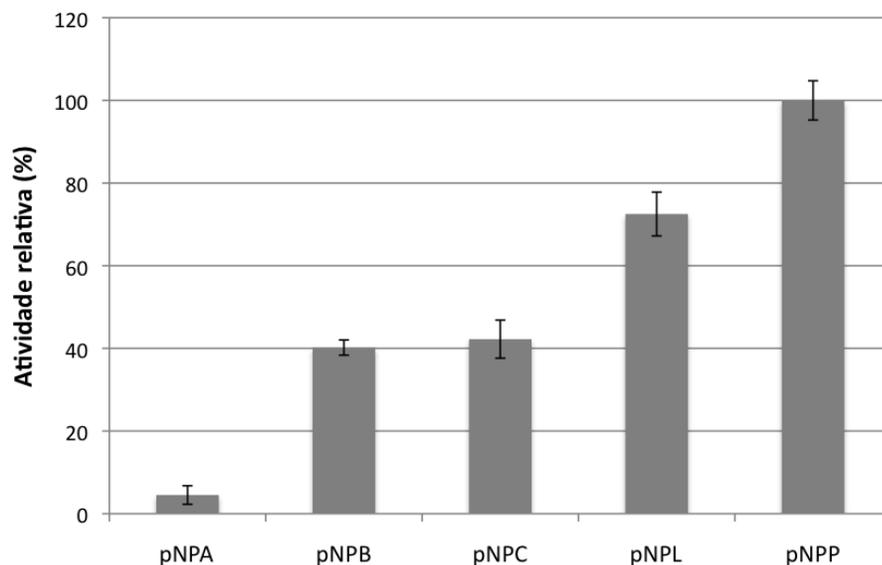


Figura 3.14: Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes substratos sintéticos. *p*-NPA: *p*-nitrofenil acetato, *p*-NPB: *p*-nitrofenil butirato, *p*-NPC: *p*-nitrofenil caprilato, *p*-NPL: *p*-nitrofenil laurato, *p*-NPP: *p*-nitrofenil palmitato.

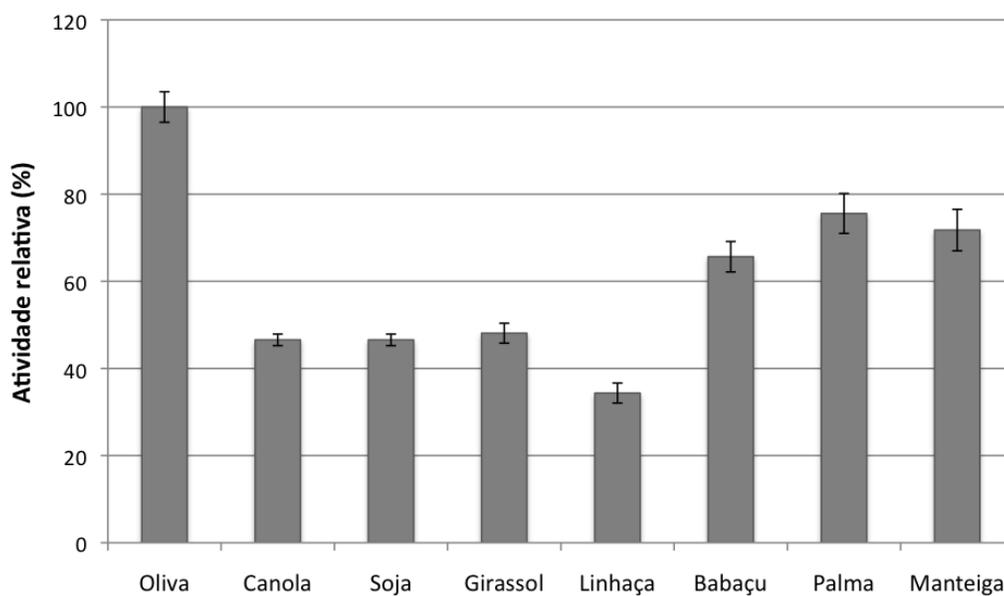


Figura 3.15: Atividade da lipase em polpa de macaúba em diferentes óleos e gorduras.

propuseram uma nova classificação para as lipases, como enzimas que catalisam reações de hidrólise e também de síntese de ésteres de ácidos graxos, capazes de atuar independentemente da presença de uma interface óleo-água, sob condições e parâmetros bem definidos, mantendo sua atividade catalítica em soluções orgânicas ou não (Lopes et al., 2011).

Outros autores investigaram a especificidade de lipases de origem vegetal em diferentes óleos e gorduras. A atividade de hidrólise do óleo de semente de mamona foi testado em diferentes óleos vegetais, apresentando atividade relativa máxima em óleo de mamona, gergelim e algodão e mostrou atividade relativa de até 50% em óleo de girassol e soja (Su et al., 2010).

### **3.3.3 Aplicação da lipase de polpa de macaúba em reações de hidrólise e esterificação**

A lipase estudada não apresenta ação relevante em reações de hidrólise, seu potencial de aplicação se destaca na síntese de ésteres de ácidos graxos. A Figura 3.16 mostra o percentual de esterificação da lipase através da reação entre 2-butanol e ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica. É possível notar que ácidos de cadeia saturada com maior número de carbonos são esterificados com maior eficiência. É o caso do ácido esteárico (C18:0), que apresentou 60% de esterificação após 48 horas de reação. Lipase produzida a partir de *Burkholderia multivorans* apresentou taxa de 50% de esterificação de vários ésteres, com atividade máxima na síntese de etil butirato, após 40 horas

de reação (Dandavate et al., 2009). Neste mesmo estudo, a lipase imobilizada aumentou seu potencial de esterificação para 100%, mostrando a viabilidade de sua aplicação em reações de síntese. A partir desta análise, é possível dizer que a lipase extraída da polpa de macaúba poderá ser usada para reações de síntese de ésteres, inclusive em sistemas orgânicos não-aquosos, já que a enzima é bastante estável em solventes orgânicos.

Su et al. (2010) encontraram resultados semelhantes para lipase de sementes de mamona. Neste caso, foi observado um aumento na atividade de esterificação diretamente proporcional ao aumento do tamanho da cadeia carbônica e ainda uma maior atividade de esterificação em ácidos graxos saturados quando comparado a um ácido graxo insaturado de mesmo tamanho de cadeia carbônica.

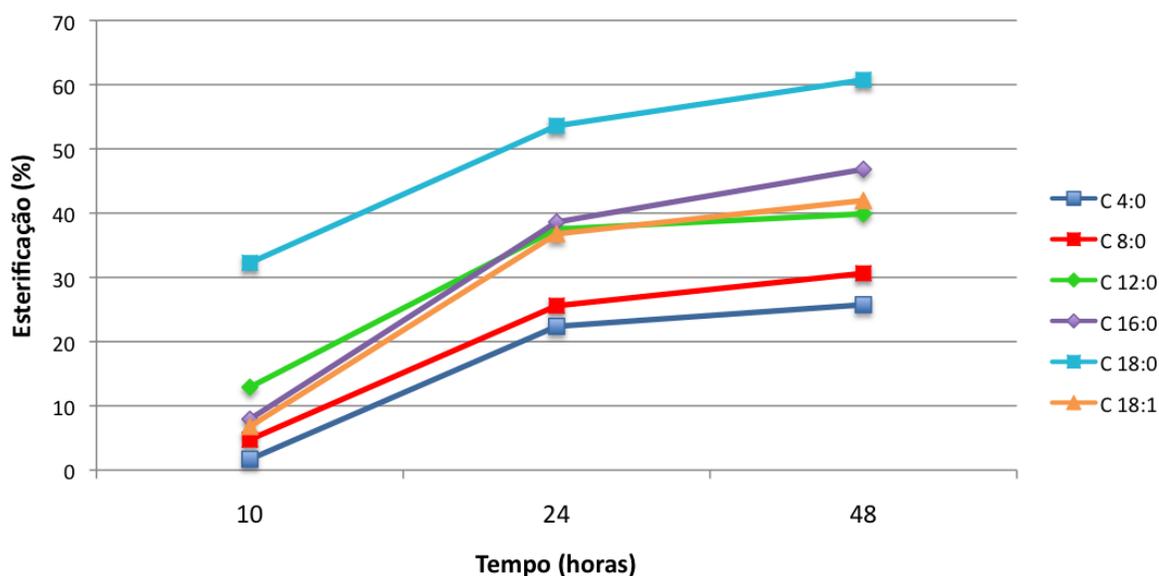


Figura 3.16: Porcentagem de esterificação de ácidos graxos utilizando-se a lipase da polpa de macaúba em até 48 horas de reação.

### 3.3.4 Termoestabilidade da lipase da polpa de macaúba

O comportamento cinético da estabilidade térmica da lipase de polpa de macaúba é mostrado na Figura 3.17, onde é possível observar o comportamento da atividade da enzima em cada temperatura ao longo do tempo de incubação. A atividade relativa da lipase decresceu com o tempo de incubação. Após 240 minutos de incubação a 40 °C a enzima apresentou mais de 60% de decréscimo em relação à sua atividade inicial.

A partir destas curvas, traçadas com os resultados obtidos da incubação da enzima em diferentes temperaturas durante períodos de tempo determinados, foram calculados alguns parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a lipase, que constituem informações relevantes sobre o processo de desnaturação térmica da enzima.

Foi observado que esta lipase segue uma cinética de desnaturação de primeira ordem. Isto significa que a desnaturação pode ocorrer em uma única etapa através da mudança do estado nativo (E) para o estado totalmente desnaturado ( $E_d$ ), a partir da ruptura de uma ligação importante para a enzima ou da deformação da estrutura tridimensional protéica (Marangoni, 2003).

A constante de desnaturação para cada temperatura avaliada é obtida a partir da linearização feita na Figura 3.18. A desnaturação térmica da lipase em diferentes temperaturas pode ser distinguida pelas diferenças nas inclinações das retas de regressão linear. Através da análise das curvas pode-se perceber que a lipase de macaúba é mais estável em temperaturas de 30 e

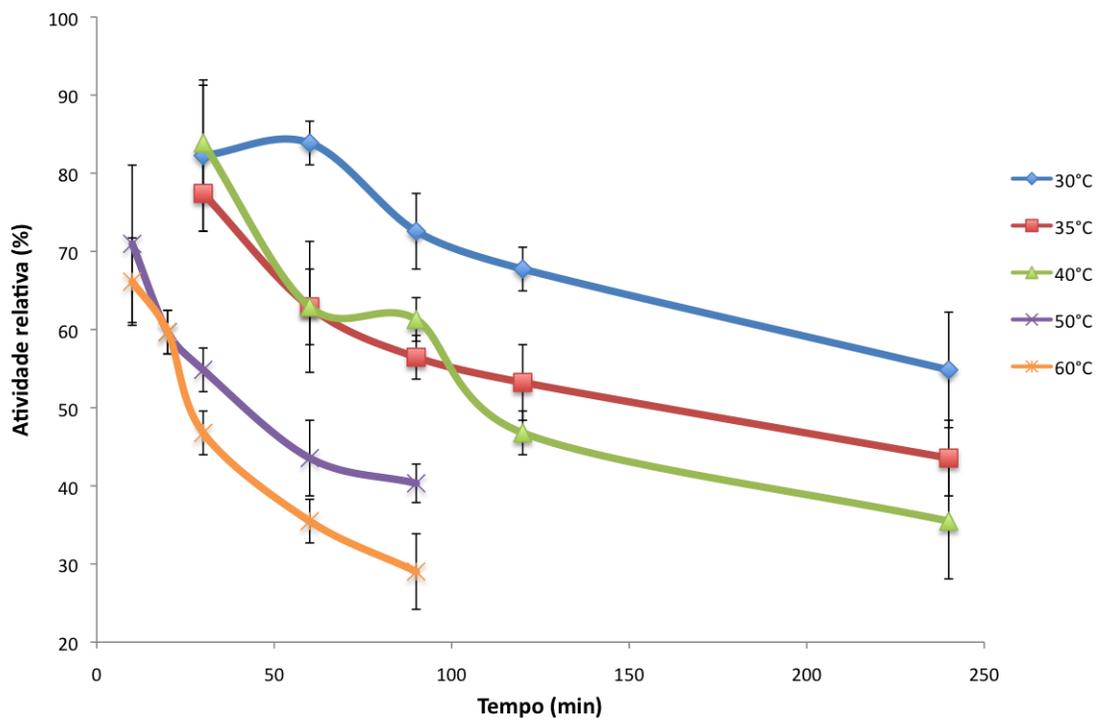


Figura 3.17: Estabilidade térmica da lipase da polpa de macaúba.

35 °C, pois a inclinação da reta é mais suave nestas temperaturas.

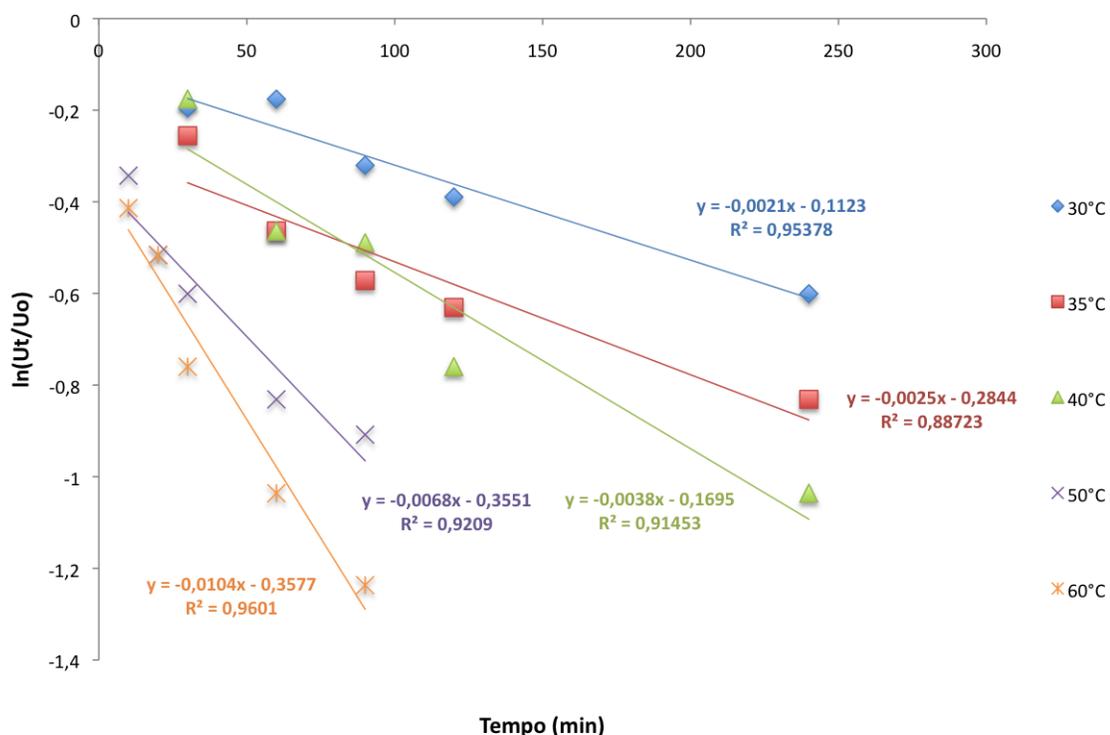


Figura 3.18: Cinética de desnaturação térmica da lipase da polpa de macaúba.

Os parâmetros cinéticos de termoestabilidade da enzima, constante de desnaturação ( $K_d$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e redução decimal ( $D$ ), estão relacionados na Tabela 3.3. O valor de  $K_d$  é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, e é possível notar um crescimento mais acentuado para as temperaturas de 50 e 60 °C, confirmando a análise visual das curvas de desnaturação que mostra menor estabilidade térmica nestas temperaturas. Consequentemente, o tempo de meia-vida e o valor  $D$  decrescem com o aumento da temperatura. A temperatura de 60 °C a enzima tem um tempo de meia-vida

de 66,6 minutos e seriam necessários 221,4 minutos para que ela reduzisse sua atividade a 10% de seu valor inicial.

Estes dados mostram que a lipase extraída da polpa de macaúba não é uma enzima termoestável. Goldbeck (2008) analisou a termoestabilidade de lipases produzidas por leveduras silvestres, e encontrou tempos de meia-vida inferiores a 4,2 minutos para todos os microrganismos testados a 55 °C. Ao comparar com uma outra enzima vegetal, mas neste caso uma esterase, é possível notar que as duas enzimas apresentam estabilidade térmica próximas em temperaturas intermediárias, entre 40 e 50 °C. Barros e Macedo (2011) encontraram um tempo de meia-vida de 204 minutos a 40 °C para esterase de soja. Neste trabalho a lipase de macaúba apresentou tempo de meia-vida de 182 minutos, nesta mesma temperatura.

A termoestabilidade de lipase de *Candida rugosa* foi estudada por Longo e Combes (1999), que obtiveram 42,5 minutos de tempo de meia-vida a 50 °C e 16 horas a 30 °C. A partir destes resultados é possível verificar que a lipase de *Candida rugosa* é bastante instável em temperaturas mais altas, mas expressivamente mais estável que a lipase de macaúba em temperaturas brandas. Estas diferenças observadas influenciarão nos resultados dos parâmetros termodinâmicos.

A Figura 3.19 ilustra a regressão do valor  $D$  obtido nas diferentes temperaturas para o cálculo do valor  $Z$ , que reflete a variação de temperatura requerida para redução de 90% da atividade enzimática. Foi verificado neste

Tabela 3.3: Perfil da taxa de desnaturação ( $K_d$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e redução decimal ( $D$ ) da lipase da polpa de macaúba.

Temperatura °C	$K_d$ $\text{min}^{-1}$	$t_{1/2}$ min	D min
30	0,0021	330,1	1096,5
35	0,0025	277,3	921,0
40	0,0038	182,4	605,9
50	0,0068	101,9	338,6
60	0,0104	66,6	221,4

estudo que para a lipase de polpa de macaúba este valor é de 41,5 °C .

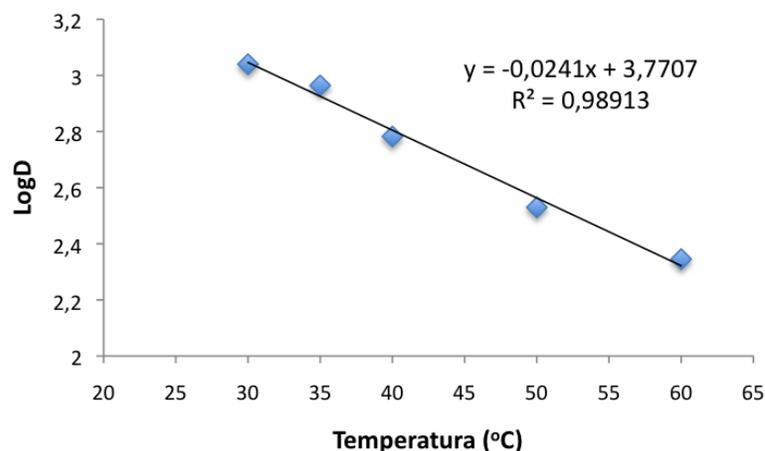


Figura 3.19: Linearização da redução decimal ( $D$ ) para o cálculo do valor  $Z$  da lipase de polpa de macaúba.

A energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ ) foi obtida a partir da Figura 3.20, que mostra a regressão linear proposta por Arrhenius para cálculo deste parâmetro termodinâmico. O valor de  $E_{ad}$  encontrado para a lipase de macaúba foi de 46,8 kJ/mol.

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação fornecem informações sobre a termoestabilidade da enzima para cada etapa do processo de desnaturação induzida pelo calor. Estes podem ajudar a detectar alguma estabilização secundária ou efeitos da desestabilização que não são verificados se apenas o tempo de meia vida for considerado. O valor de  $E_{ad}$  corresponde à energia necessária para a mudança da conformação da enzima, assim quanto maior seu valor maior é a energia para que ocorra a desnaturação da enzima e, portanto, maior a resistência térmica desta (Longo e Combes, 1999).

A comparação com os resultados de outros estudos, 59,4 kJ/mol para esterase de soja (Barros e Macedo, 2011), 203,7 kJ/mol para lipase de levedura silvestre (Goldbeck, 2008), 330,1 kJ/mol para lipase de *Geotrichum candidum* (Burkert et al., 2004), mostra que a energia necessária para a mudança de conformação da lipase de macaúba é bastante baixa, o que faz dela uma enzima de baixa resistência térmica. Este valor é bastante próximo ao resultado encontrado para esterase de soja, que também é uma enzima vegetal, mas muito inferior ao de lipases produzidas por microrganismos, mostrando que estas têm maior resistência térmica, apesar de sua estabilidade diminuir consideravelmente em temperaturas mais altas.

A Tabela 3.4 apresenta os valores calculados para os parâmetros de entalpia ( $\Delta H$ ), energia livre ( $\Delta G$ ) e entropia ( $\Delta S$ ).

Os resultados para  $\Delta H$  tiveram uma variação muito baixa em relação à temperatura avaliada, indicando que não há variação da capacidade térmica

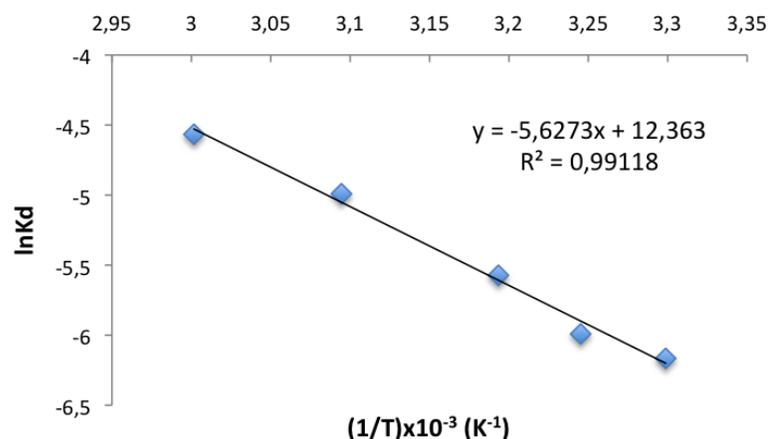


Figura 3.20: Formalização dos cálculos experimentais por Arrhenius para o cálculo de  $E_{ad}$  da lipase de polpa de macaúba.

da enzima estudada. Valores positivos e elevados de entalpia podem estar associados a uma enzima termoestável, uma vez que maior quantidade de energia é necessária para a ocorrência do processo de desnaturação. O valor de  $\Delta H$  pode ser também correlacionado com o número de ligações não covalentes rompidas durante o processo de desnaturação (Marangoni, 2003; Barros e Macedo, 2011).

A energia livre é o parâmetro termodinâmico que revela com maior exatidão as características de estabilidade térmica de uma enzima. Está diretamente relacionada à estabilidade proteica, uma vez que valores positivos baixos ou negativos indicam que o processo de desnaturação ocorre mais rapidamente. Assim como ocorreu com a entalpia, os valores de  $\Delta G$  são praticamente estáveis, independentemente da temperatura empregada. Lipase de *Candida rugosa* apresentou valor de  $\Delta G$  de 198 kJ/mol na temperatura de 50

°C (Longo e Combes, 1999), enquanto Barros e Macedo (2011) encontraram 61 kJ/mol em esterase de soja. A lipase de macaúba apresenta baixa estabilidade térmica, principalmente quando comparada a outras lipases, como as produzidas por microrganismos.

Tabela 3.4: Parâmetros de entalpia ( $\Delta H$ ), energia livre ( $\Delta G$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) da lipase da polpa de macaúba.

Temperatura °C	$\Delta H$ KJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ KJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
30	44,26	25,86	60,71
35	44,22	25,84	59,66
40	44,18	25,17	60,72
50	44,10	24,41	60,93
60	44,02	23,99	60,12

### 3.4 Conclusões

Os dados obtidos revelam a presença de lipase ácida no mesocarpo de macaúba, com atividade ótima em pH 5,5 e maior estabilidade na faixa de pH entre 6,0 e 7,0. Apresentou atividade máxima a 40 °C e estabilidade entre 25 e 40 °C. Possui baixa atividade hidrolítica, porém com promissora atuação na síntese de ésteres. Esta enzima apresenta potencial para ser usada na produção de biodiesel e na síntese de monoacilgliceróis.

## Referências Bibliográficas

- Abigor, R. D.; Uadia, P. O.; Foglia, T. A.; Haas, M. J.; Scott, K.; Savary, B. J. (2002). Partial Purification and Properties of Lipase From Germinating Seeds of *Jatropha curcas L.* *Journal of America Oil Chemist Society*, 79:1123–1127.
- Barros, M.; Macedo, G. A. (2011). Biochemical characterization of esterase from soybean (*Glycine max L.*). *Food Science and Biotechnology*, 20(5):1195–1201.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Burkert, J. F. M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp* using factorial design. *Bioresource Technology*, 91:77–84.
- Coimbra, M. C.; Jorge, N. (2012). Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal of Science and Food Agricultural*, 92:679–684.
- Dandavate, V.; Jinjala, J.; Keharia, H.; Madamwar, D. (2009). Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase

- from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, 100:3374–3381.
- Eastmond, P. J. (2004). Cloning and Characterization of the Acid Lipase from Castor Beans. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44):45540–45545.
- Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. (2008). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*, cap. 16 - Lipases em Biocatálise, p. 369–386. Ed. Interciência.
- Goldbeck, R. (2008). Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Hellyer, S. A.; Chandler, I. C.; Bosley, J. A. (1999). Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the compositions of the seed triglyceride? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1440:215–224.
- Hiane, P. A.; Ramos, M. M.; Ramos, M. I. L.; Macedo, M. L. R. (2005). Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(3):256–259.
- Kapranckov, V. S.; Zhrebtsov, N. A.; Popova, T. N. (2004). Purification and Characterization of Lipase from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germ. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1):84–88.

- Kruger, M. J. (1996). *The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook*. Humana Press Inc.
- Longo, A. A.; Combes, D. (1999). Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74:25–32.
- Lopes, D. B.; Fraga, L. P.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31:608–613.
- Lorenzi, G. M. A. C. (2006). *Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável. Tese de Doutorado*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 172p.
- Macedo, G. A. (1995). Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *geotrichum sp.* Dissertação de Mestrado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP*, 121p.
- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme Kinetics: A modern approach*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Ory, R.; Angelo, A. J. S.; Altschul, A. M. (1962). The acid lipase of the castor bean. Properties and substrate specificity. *Journal of Lipid Research*, 3:99–105.

- Pancera, S. M. (2006). *Estudo da interação entre polímeros e proteínas*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 133p.
- Panzanaro, S.; Nutricati, E.; Miceli, A.; Bellis, L. D. (2010). Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea L.*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:741–745.
- Polizelli, P. P. (2008). *Caracterização bioquímica de lipase extraída de sementes oleaginosas de Pachira aquatica*. Tese de Doutorado, UNESP - São José do Rio Preto - SP, 126p.
- Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94:2319–2358.
- Sagiroglu, A.; Arabaci, N. (2005). Purification and Characterization of Lipase from Sunflower Seed. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35:37–42.
- Sana, N. K.; Hossin, I.; Haque, E. M.; Shaha, R. K. (2004). Identification, purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus L.*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7:246–255.
- Su, E. Z.; Zhou, Y.; You, P. Y.; Wei, D. Z. (2010). Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. *J Shanghai Univ (Engl Ed)*, 14(2):137–144.

- Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science Technology*, 105:308–317.
- Vorderwulbeck, T.; Klieslich, K.; Erdmann, H. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microbial Technology*, 14:631–639.
- Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker, Inc., 2nd. edition.
- Yesiloglu, Y.; Baskurt, L. (2008). Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38:397–402.

## Capítulo 4

# Estudo dos compostos bioativos em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)

### 4.1 Introdução

Vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de antioxidantes naturais, tais como frutas e legumes frescos, chás e alimentos ricos em polifenóis, tem efeito protetor contra alguns tipos de câncer e doenças degenerativas devido, em parte, à presença de compostos como vitaminas, flavonóis, antocianinas e outros compostos fenólicos (Ali et al., 2008; Matteo e Esposito, 2003; Klimczak et al., 2007).

O Brasil tem uma grande variedade de espécies vegetais exóticas, especialmente frutas, cuja composição e potencial antioxidante ainda não foram completamente estudados. Tais espécies podem ser de amplo interesse para a agroindústria, além de constituir uma possível fonte de renda para a popula-

ção local. Dentre os biomas brasileiros, o cerrado concentra muitas espécies de frutas nativas, consideradas importantes fontes nutricionais e com potencial para aproveitamento comercial e tecnológico (Ramos et al., 2008; Almeida et al., 2011). Diferentes metodologias têm sido utilizadas para medir a capacidade antioxidante em extratos vegetais, e estudos mostram que apenas um método não é suficiente para avaliar adequadamente a capacidade antioxidante de um produto natural, devido à variedade de compostos presentes em frutas ou vegetais e os diferentes tipos de ação antioxidante que esses compostos podem exercer (Dudonné et al., 2009; Thaipong et al., 2006).

Os métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante da amêndoa e polpa de macaúba no presente estudo, foram escolhidos devido a algumas características e particularidades, como mecanismo de ação antioxidante, radical usado, reprodutibilidade e facilidade de uso.

A medida da capacidade antioxidante realizada com o radical ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) mostrou ter uma boa reprodutibilidade quando aplicada em diferentes laboratórios (Buenger et al., 2006) e, particularmente, é bastante interessante para ser usada em extratos vegetais, pois seu comprimento de onda de absorção (734 nm) minimiza os efeitos interferentes relativos à coloração da amostra (Dudonné et al., 2009). A metodologia ORAC (oxygen radical absorbance capacity) consiste na medida do decaimento da fluorescência de uma proteína, fluoresceína, decorrente de danos oxidativos causados por radicais peróxila ( $\text{ROO}\cdot$ ). A reação é bastante

sensível ao pH e à temperatura, e deve ser feita em equipamento automatizado para melhor controle dos parâmetros e, portanto, maior reprodutibilidade dos resultados. Porém, apesar de ser um teste mais caro e demorado, tem vantagens que justificam seu uso em ensaios de determinação da capacidade antioxidante em alimentos, como a possibilidade de combinar as medidas de tempo e grau de inibição oxidativa em um único resultado, alta correlação entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios e o fato de ser o único teste de determinação de capacidade antioxidante *in vitro* que utiliza um radical fisiologicamente relevante (Ou et al., 2001).

Além da escolha da metodologia adequada para se medir a capacidade antioxidante em um determinado tipo de amostra, é necessário fazer um estudo dos procedimentos de extração e preparação da amostra. Geralmente, extratos fenólicos de plantas são obtidos a partir de agitação em soluções aquosas de solventes orgânicos e posterior centrifugação (Mukhopadhyay et al., 2006). No entanto, não existe um único solvente que seja ideal para extrair todos os antioxidantes presentes em um alimento, especialmente se estes estiverem complexados com proteínas ou carboidratos. Conseqüentemente, parte destes antioxidantes estão presentes nos resíduos de extração, os quais são frequentemente ignorados durante as análises (Péres-Jimenez et al., 2008). Desta forma, a determinação da capacidade antioxidante em alimentos deve ser realizada tanto no extrato obtido quanto no seu resíduo.

Neste capítulo, são apresentados os resultados do estudo realizado em

polpa e amêndoa de macaúba para investigação de seu teor total de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

## 4.2 Material e métodos

As amostras de *Acrocomia aculeata* foram coletadas no município de Ponta Porã - MS. A coleta foi feita com os frutos que já estavam no solo, em condições semelhantes de maturação, casca amarelo-esverdeada, firmes e de aparência intacta. Os frutos foram descascados, despulpados, e o endosperma quebrado para obtenção da amêndoa. As frações polpa e amêndoa de macaúba foram estocadas separadamente em ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração dos compostos fenólicos e realização das análises para determinação de sua capacidade antioxidante.

### 4.2.1 Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos da amêndoa e polpa de macaúba (Figuras 4.1 e 4.2). Cada porção do fruto foi submetida separadamente à extração com diferentes solventes. Foram utilizados água e os solventes orgânicos álcool etílico, álcool metílico, acetona e acetato de etila, em solução aquosa na proporção de 1:1 (v/v). Cada mistura foi submetida a homogeneização durante 5 minutos e agitação em banho a  $50^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos, sendo

em seguida filtrada em gaze e o resíduo reextraído nas mesmas condições. O filtrado foi centrifugado a 4 °C durante 30 minutos a 10000 x *g* e o sobrenadante evaporado sob vácuo a 40 °C. O extrato concentrado e o resíduo foram liofilizados por 48 horas em liofilizador Liotop L101 e armazenados a -18 °C até utilização posterior (Shui e Leong, 2006).

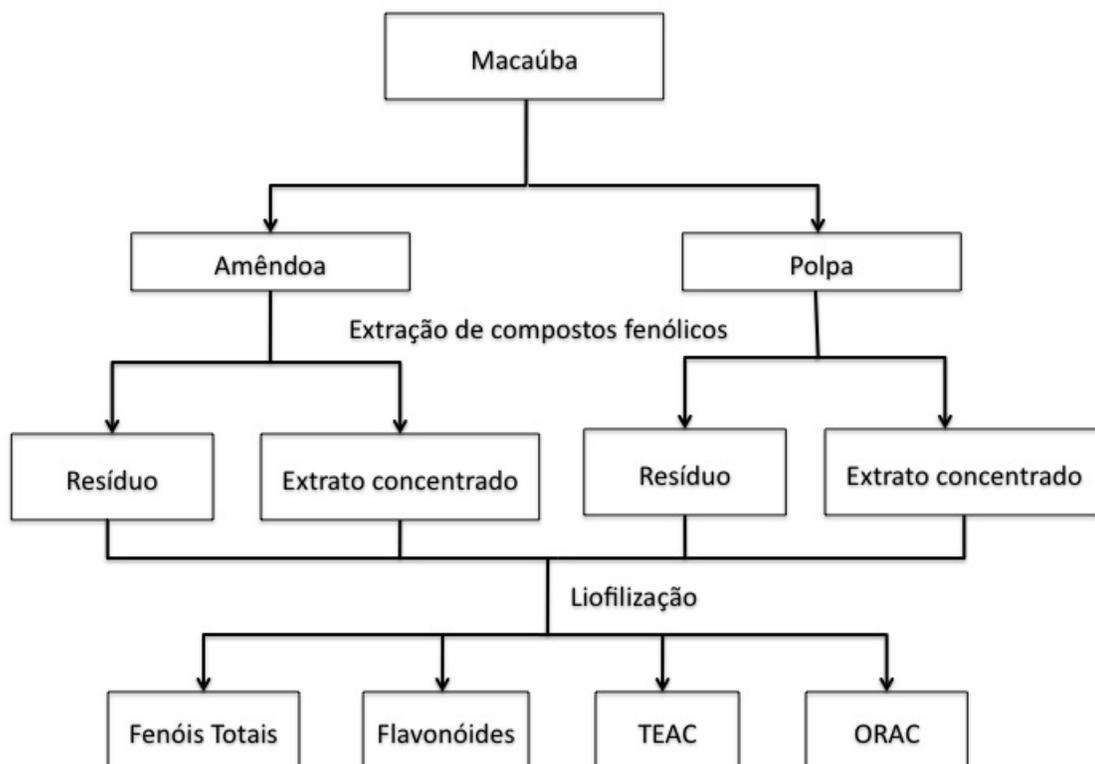


Figura 4.1: Esquema do processo de extração de compostos fenólicos em polpa e amêndoa do fruto da macaúba. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity.

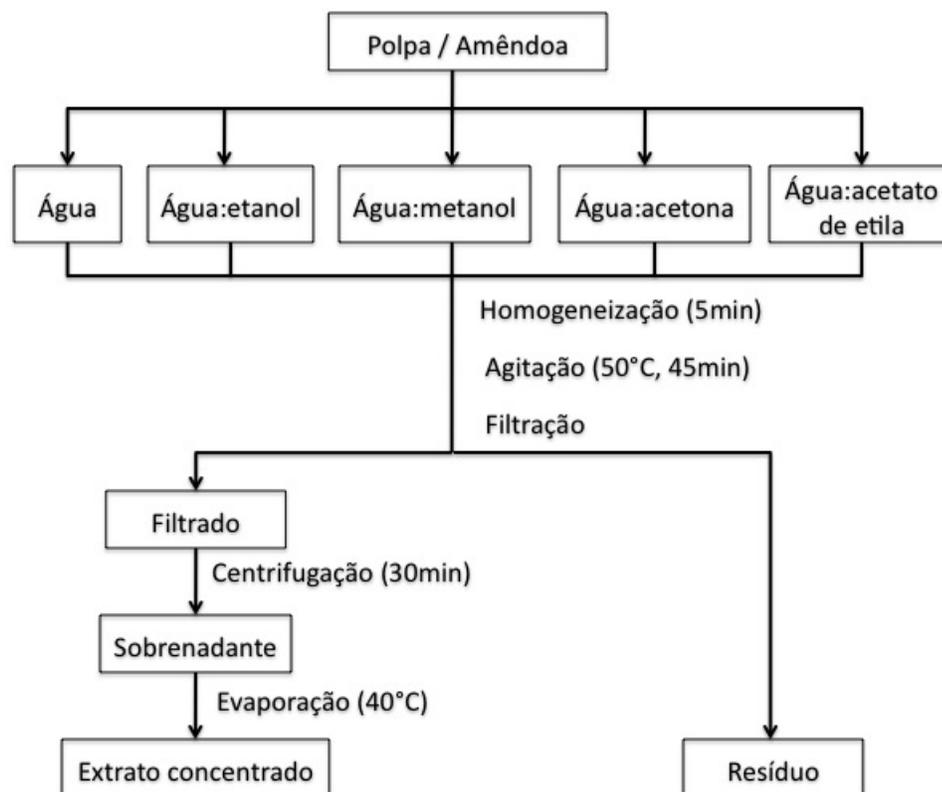


Figura 4.2: Fluxograma detalhado do processo de extração de compostos fenólicos em macaúba.

### 4.2.2 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados colorimetricamente através do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965). Uma alíquota de 2 mL de amostra diluída em água destilada foi adicionada a 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu, e em seguida foi adicionado 9 mL de água destilada. Após 3 minutos adicionou-se 8 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após repouso durante 2 h a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 760 nm. Foi preparada uma curva padrão de ácido gálico, e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico.

### 4.2.3 Flavonoides

A medida de flavonoides totais foi realizada através do método colorimétrico descrito por Chun et al. (2005). Uma alíquota de 1 mL de amostra foi adicionada a 4 mL de água deionizada. Após 5 minutos adicionou-se 0,3 mL de  $\text{NaNO}_2$  5% e 0,3 mL de  $\text{AlCl}_3$  10%. Após 1 minuto adicionou-se 2 mL de  $\text{NaOH}$  1 M e o volume completado com água deionizada para 10 mL. A absorvância foi medida em comprimento de onda de 510 nm e os flavonoides totais expressos em mg de catequina equivalente (CE)/g de fruta fresca.

#### 4.2.4 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Este teste mede a habilidade de um composto antioxidante sequestrar o cátion  $ABTS^+$  (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) em comparação ao composto padrão Trolox<sup>®</sup>. A metodologia utilizada foi proposta por Re et al. (1999).

A metodologia  $ABTS^+$  original foi baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência de antioxidantes, para produzir um radical cátion. Atualmente, a metodologia envolve a produção direta do cromóforo  $ABTS^+$ , com tonalidade azul esverdeada através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. Esta técnica espectrofotométrica mede a habilidade relativa de antioxidantes de sequestrar o  $ABTS^+$  em comparação ao potencial antioxidante de quantidades padrão de Trolox<sup>®</sup>. Trolox<sup>®</sup> é um análogo da vitamina E, solúvel em água, e o cátion  $ABTS^+$  é um cromóforo azul esverdeado com características de absorção a 734 nm, que quando é reduzido a ABTS, perde sua coloração. Os resultados são expressos em mM de Trolox/g de fruta fresca.

Em resumo, o monocátion  $ABTS^+$  é gerado a partir da oxidação do ABTS com persulfato de potássio e reduzido na presença de compostos antioxidantes capazes de doar hidrogênio. Esta metodologia mede a atividade antioxidante, determinada pela descoloração do  $ABTS^+$  medida por meio da redução do radical cátion expressa em porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm. A taxa de descoloração é função da concentração e tempo, e relaciona-se à

reatividade do Trolox<sup>®</sup>, sob as mesmas condições.

Para o preparo da solução de ABTS<sup>•+</sup> fez-se a dissolução do ABTS em água na concentração de 7 mM, e misturou-se com persulfato de potássio 2,45 mM. A mistura foi deixada no escuro por 12h. Diluiu-se esta solução com etanol até atingir a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. A amostra foi diluída de forma que ao adicionar 10  $\mu$ l da amostra diluída na solução fosse possível obter 20 a 80% da absorbância em relação ao branco. O ensaio foi realizado em espectrofotômetro com leitor de microplacas, adicionando-se 50  $\mu$ L de amostra / Trolox e 250  $\mu$ L de radical ABTS<sup>•+</sup>. A curva padrão foi feita com Trolox<sup>®</sup> em soluções até concentração máxima de 15  $\mu$ M. As amostras foram lidas em intervalos regulares de 5 minutos durante um total de 120 minutos.

#### **4.2.5 ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)**

A metodologia ORAC (oxygen radical absorbance capacity) mede a capacidade sequestrante contra o radical peroxila. O radical peroxila foi gerado a partir do radical 2,2-azo-bis (2-amidino-propano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C. A fluoresceína (FL) é usada como substrato nas condições de 485 nm para excitação e emissão a 520 nm. A reação consistiu de 20  $\mu$ L de amostra diluída em tampão fosfato 75 mM pH 7,4 adicionada de 120  $\mu$ L de fluoresceína (70 nM) e 60  $\mu$ L de radical AAPH (12 mM). Esta reação foi

feita em microplaca com 96 poços, que após a adição do radical foi imediatamente colocada em leitor de placas NovoStar (BMG LABTECH, Alemanha) e a fluorescência lida durante 80 minutos, em intervalos de 1 minuto. O branco (FL + AAPH) foi feito usando-se o tampão fosfato 75 mM pH 7,4 no lugar do radical e soluções padrão de Trolox<sup>®</sup> em concentrações de 1 a 1000  $\mu\text{M}$ . Os valores ORAC foram calculados através da área líquida abaixo da curva de decaimento da fluoresceína (net AUC). As curvas de cada amostra foram inicialmente normalizadas em relação à curva do branco correspondente ao mesmo ensaio, multiplicando-se cada valor lido pelo fator  $fluorescencia_{branco,t(0)}/fluorescencia_{amostra,t(0)}$ . Através das curvas normalizadas, a área (AUC) foi calculada pela Equação 4.1.

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{80} f_i/f_0 \quad (4.1)$$

onde  $f_0$  é a fluorescência inicial lida no tempo 0 e  $f_i$  é a fluorescência lida no tempo  $i$ . A área líquida abaixo da curva (net AUC) é a diferença entre a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína correspondente a cada amostra e a área do branco. Para todas as amostras foram calculadas as equações de linearização através da curva (net AUC x concentração de antioxidante), para a obtenção dos coeficientes angular, linear e de regressão linear. Os resultados foram expressos em Trolox equivalente (mmol TE/g de fruta fresca) (Dávalos et al., 2004).

## 4.2.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos fenólicos de polpa de macaúba foi avaliada através da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição (Ellof, 1998).

### 4.2.6.1 Preparo de inóculo padronizado

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução salina, sendo a densidade ótica acertada até turbidez correspondente a solução de Mc Farland 0,5 a 625 nm (absorbância entre 0,08 e 0,10 para bactérias e *Candida albicans*), seguido da diluição indicada para cada tipo de microrganismo. Os microrganismos utilizados neste ensaio foram: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* 11775, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria innocua* e *Bacillus cereus*.

### 4.2.6.2 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100  $\mu$ L dos meios de cultura, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50  $\mu$ L da solução do material a ser testado, de concentração co-

nhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  dos mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material. Os 100  $\mu\text{L}$  finais foram desprezados. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inóculo do microrganismo a ser avaliado, cuja turvação foi comparada à escala McFarland 0,5, seguido de diluição para concentração final de  $10^4$  células/mL (bactérias) e  $10^3$  células/mL (*C. albicans*). As placas foram seladas com Parafilm<sup>®</sup> e incubadas por 24 a 48 horas à 36 °C. Após este período as placas foram avaliadas e a MIC definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento dos microrganismos.

#### 4.2.6.3 Leitura dos resultados

Bactérias: Após o período de incubação foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução de 2,3,5-cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) e as placas reincubadas por 3 h. A MIC é definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória. No caso das bactérias, foram realizadas leituras das placas no início e final de cada ensaio, em leitora de microplacas de Elisa (ASYS) para confirmação da presença ou ausência de

crescimento microbiano.

*Candida albicans*: Após o período de incubação foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

#### **4.2.7 Tratamento estatístico**

Os resultados quantitativos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

### **4.3 Resultados e discussão**

A determinação da capacidade antioxidante em alimentos envolve três passos distintos: a preparação da amostra e extração de antioxidantes, o método analítico usado para medir a capacidade antioxidante e a forma escolhida para expressar os resultados. Uma extração eficiente deve envolver o uso de solventes de diferentes polaridades, pois enquanto alguns antioxidantes têm preferência por solventes polares, como etanol e metanol, outros solventes, como o clorofórmio e acetato de etila são capazes de extrair antioxidantes lipofílicos. A determinação da capacidade antioxidante nos resíduos também é importante, pois este pode conter taninos hidrolisáveis, compostos fenólicos

ligados a carboidratos e proteínas, e proantocianidinas que não puderam ser extraídas pelo procedimento de mistura e agitação em soluções com solventes orgânicos (Péres-Jimenez e Saura-Calixto, 2008).

Em estudo realizado por Luthria e Mukhopadhyay (2006) para otimizar os parâmetros de extração de ácidos fenólicos em berinjela, concluiu-se que o método de agitação em solução água:metanol (80%), seguido de centrifugação foi um dos que apresentaram maior concentração de ácidos fenólicos, inferior apenas à extração em líquido pressurizado. Foi observado também que a mistura de água a um solvente orgânico aumenta sua eficiência de extração.

Shui e Leong (2006) testaram diferentes métodos de extração de compostos fenólicos em carambola, variando os solventes e suas proporções, temperatura e tempo de extração. De acordo com seus resultados, a atividade antioxidante foi maximizada com o aumento da temperatura, em solução de acetona:água, na proporção de 1:1 (v/v) e tempo de extração entre 30 e 60 minutos. Desta forma, os parâmetros de extração de compostos fenólicos em macaúba foram estabelecidos em temperatura de 50 °C e 45 minutos em soluções aquosas de diferentes solventes orgânicos, sempre na proporção de 1:1 (v/v). Os solventes orgânicos usados na extração foram escolhidos devido à sua diferença de polaridade. A Tabela 4.1 lista os solventes utilizados, em ordem decrescente de polaridade, definidas por sua constante dielétrica e também pelo valor  $E_T$ , que corresponde à energia de transição para a banda de absorção de maior comprimento de onda do corante betaina (2) piridinium-N-fenóxido

Tabela 4.1: Solventes utilizados na extração de compostos fenólicos em macaúba.

Código	Solvente	Constante dielétrica	$E_T$ (Kcal/mol)
Ag	Água	80,1	63,1
Me	Metanol	32,7	55,4
Et	Etanol	24,5	51,9
Ac	Acetona	20,7	42,2
Ae	Acetato de etila	6,0	38,9

Fonte: (Reichardt, 1994)

dissolvido, medido em kcal . mol<sup>-1</sup>, a partir da Equação 4.2.

$$E_T = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_a = 2,859 \times 10^{-3} \cdot \nu \quad (4.2)$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $c$  é a velocidade da luz,  $\nu$  é o comprimento de onda correspondente a transição, expresso em cm<sup>-1</sup>, e  $N_a$  é o número de Avogrado.

Os resultados para o teor de fenóis totais, flavonoides, TEAC e ORAC para amêndoa e polpa de macaúba são mostrados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente. É possível observar, de maneira geral, que a fração de extrato concentrado da polpa possui maior capacidade antioxidante que a amêndoa. Nota-se, ainda, que a extração de compostos fenólicos da polpa foi mais eficiente, já que há maior capacidade antioxidante presente no extrato concentrado, quando comparado ao resíduo, fato que não é evidenciado nos resultados da amêndoa, quando se compara as frações de extrato concentrado e resíduo. Em seguida, serão discutidos os resultados de cada análise, individualmente.

Tabela 4.2: Teores de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante em amêndoa de macaúba.

Amostra	Fenóis Totais mg GAE/100g	flavonoides mg CE/100g	TEAC $\mu\text{mol TE/g}$	ORAC $\mu\text{mol TE/g}$
Extrato concentrado				
Ag	7,5±0,7 <sup>a</sup>	7,2±0,5 <sup>a</sup>	0,53±0,04 <sup>a</sup>	6,9±0,8 <sup>a</sup>
Et	31±2 <sup>b</sup>	21,9±0,6 <sup>b</sup>	1,80±0,02 <sup>b</sup>	23±3 <sup>b</sup>
Me	21±1 <sup>c</sup>	13,1±0,7 <sup>c</sup>	1,55±0,04 <sup>c</sup>	12,1±0,6 <sup>c</sup>
Ac	25±1 <sup>c</sup>	20±1 <sup>a</sup>	1,83±0,01 <sup>b</sup>	11,7±0,6 <sup>c</sup>
Ae	12±2 <sup>d</sup>	2,0±0,2 <sup>d</sup>	0,23±0,08 <sup>d</sup>	5,2±0,2 <sup>a</sup>
Resíduo				
Ag	22± 5 <sup>a</sup>	3,7±0,2 <sup>a</sup>	8,1±0,7 <sup>ab</sup>	1,8±0,9 <sup>a</sup>
Et	23± 8 <sup>a</sup>	1,9±0,6 <sup>b</sup>	4,9 ±0,8 <sup>bc</sup>	2,7±0,2 <sup>a</sup>
Me	35± 4 <sup>a</sup>	12,2±0,6 <sup>c</sup>	11± 2 <sup>a</sup>	17± 1 <sup>b</sup>
Ac	15± 5 <sup>ab</sup>	1,6±0,2 <sup>b</sup>	4±2 <sup>c</sup>	3,1±0,8 <sup>a</sup>
Ae	5±1 <sup>b</sup>	1,2±0,3 <sup>b</sup>	2,5±0,6 <sup>bc</sup>	1,4±0,5 <sup>a</sup>

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a  $p \leq 0,05$ , separadamente para sobrenadante e precipitado. Resultados expressos por massa de fruta fresca. GAE: ácido gálico equivalente; CE: catequina equivalente; TE: Trolox equivalente; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity.

### 4.3.1 Fenóis totais

Na amêndoa de macaúba a extração etanólica foi a mais eficiente, 31 mg GAE/100g. No entanto, o teor de fenóis totais extraídos está muito próximo aos valores obtidos no resíduo, mostrando que o método de extração empregado não é adequado para amêndoas, já que grande parte dos compostos fenólicos permaneceram no resíduo. A polpa apresentou maior concentração de fenóis totais no extrato metanólico, 78 mg GAE/100g.

Os valores para concentração de fenóis totais encontrados na polpa de

Tabela 4.3: Teores de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante em polpa de macaúba.

Amostra	Fenóis Totais mg GAE/100g	flavonoides mg CE/100g	TEAC $\mu\text{mol TE/g}$	ORAC $\mu\text{mol TE/g}$
Extrato concentrado				
Ag	39 $\pm$ 2 <sup>ad</sup>	20 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	7,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
Et	44 $\pm$ 1 <sup>ac</sup>	35 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
Me	78 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	68 $\pm$ 8 <sup>c</sup>	9,6 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	36 $\pm$ 3 <sup>c</sup>
Ac	48 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	38 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	8,3 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	17 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>
Ae	33 $\pm$ 1 <sup>d</sup>	26 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>
Resíduo				
Ag	3 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,9 <sup>ac</sup>	6,5 $\pm$ 0,4 <sup>abd</sup>
Et	9 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>ac</sup>	4,9 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Me	42 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	31 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	11 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	16 $\pm$ 3 <sup>c</sup>
Ac	36 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	9,7 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	5,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>
Ae	3,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	5,7 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a  $p \leq 0,05$ , separadamente para sobrenadante e precipitado. Resultados expressos por massa de fruta fresca. GAE: ácido gálico equivalente; CE: catequina equivalente; TE: Trolox equivalente; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity.

macaúba podem ser comparados com os resultados obtidos de polpa de frutas descritos por outros autores. Kuskoski et al. (2005) encontraram alto teor de fenóis em acerola e manga (580 e 555 mg GAE/100g de polpa) e teores baixos, em torno de 20 mg GAE/100g, para polpas de cupuaçu e maracujá. Almeida et al. (2011) estudaram a atividade antioxidante em vários frutos do nordeste brasileiro, encontrando concentrações que variaram de 13 a 160 mg GAE/100g da porção comestível do fruto.

Há também uma grande variação da quantidade de fenóis totais e capacidade antioxidante em diferentes variedades de uma mesma espécie de fruto, exemplificado no estudo de Ma et al. (2011) com oito variedades de manga, onde foram encontrados teores de compostos fenólicos variando entre 8,7 e 193 mg GAE/ 100g de fruta fresca. Desta forma, pode-se dizer que a quantidade de fenóis totais em um fruto pode ser influenciado não apenas pelo método de extração, mas também pela variedade do fruto, região e estágio de maturação.

Chun et al. (2005) analisaram o teor de fenóis totais em extratos metanólicos de frutas e vegetais. Há uma grande variação na concentração de fenóis totais entre as diferentes frutas, sendo a maior concentração para ameixa (368 mg GAE/100g) e a menor 11 mg GAE/100g para melão. Frutas como pêra (70 mg GAE/100g) e abacate (58 mg GAE/100g) são as que apresentam o teor de compostos fenólicos mais similares aos teores encontrados em polpa de macaúba.

O óleo extraído da polpa e amêndoa de macaúba foi estudado por Coimbra

e Jorge (2012), que encontraram alto teor de compostos fenólicos no óleo das frações da fruta. O óleo da amêndoa de macaúna apresentou concentração de fenóis totais de 4,38 mg GAE/g e o óleo da polpa um total de 2,21 mg GAE/g. O teor de fenóis totais encontrado na polpa de macaúba é quase três vezes inferior ao encontrado no óleo da polpa, e a diferença entre a amêndoa e o óleo da amêndoa é ainda maior, pois este contém cerca de 20 vezes mais compostos fenólicos que o encontrado no extrato concentrado da amêndoa. Esta observação reforça o fato de que grande parte dos compostos fenólicos está localizada na fração lipídica do fruto.

### **4.3.2 Flavonoides**

O extrato metanólico foi o que apresentou o maior rendimento para o teor de flavonoides no extrato concentrado e resíduo de polpa e resíduo de amêndoa. No extrato concentrado de amêndoa, o extrato etanólico foi o de maior rendimento, com 21,9 mg CE/100g. A maior concentração de flavonoides foi determinada no extrato concentrado da polpa, 68 mg CE/100g de fruta fresca. Há várias metodologias diferentes para se determinar o teor de flavonoides totais em alimentos, e por esta razão, torna-se difícil a comparação dos resultados, principalmente por que diferentes compostos são usados como padrão: rutina (Ma et al., 2011; Zhishen et al., 1999), catequina (Chun et al., 2005; Kim et al., 2003; Ferreira et al., 2010), e quercetina (Lin e Tang, 2007).

O teor de flavonoides totais em maçã gala foi de 62 mg CE/100 g de fruta fresca e de até 237 mg CE/100 g em ameixas (Kim et al., 2003). Chun et al. (2005) estudaram o teor de flavonoides em vários frutos, encontrando valores entre 194 e 0,6 mg CE/100g de polpa em base úmida. As maiores concentrações de flavonoides foram em ameixa e maçã e as menores em melão e *grapefruit*. Morango, cereja e limão são os frutos que mais se aproximam dos teores de flavonoides encontrados na polpa de macaúba, com valores entre 40 e 50 mg CE/100g.

### **4.3.3 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)**

Os ensaios TEAC foram realizados em intervalos de 5 minutos durante 120 minutos. Desta forma, foi possível traçar as curvas do comportamento antioxidante da amostra ao longo do tempo (Figura 4.3). A análise do perfil cinético desta reação mostra que o extrato concentrado da amêndoa e polpa de macaúba tem um aumento gradual de sua capacidade antioxidante nos primeiros 60 minutos, e se mantém praticamente constante após este tempo. Os resíduos de polpa e amêndoa, por sua vez, apresentaram um comportamento antioxidante bastante irregular, contudo, ainda é possível perceber que há uma tendência de mudança de comportamento cinético aos 60 minutos de reação, onde após a ocorrência de pontos de inflexão nas curvas de quase todos os tratamentos, a função atinge seu valor máximo. Por esta razão, a

leitura realizada aos 60 minutos de reação com o radical ABTS foi escolhida para representar o valor TEAC de cada uma das amostras.

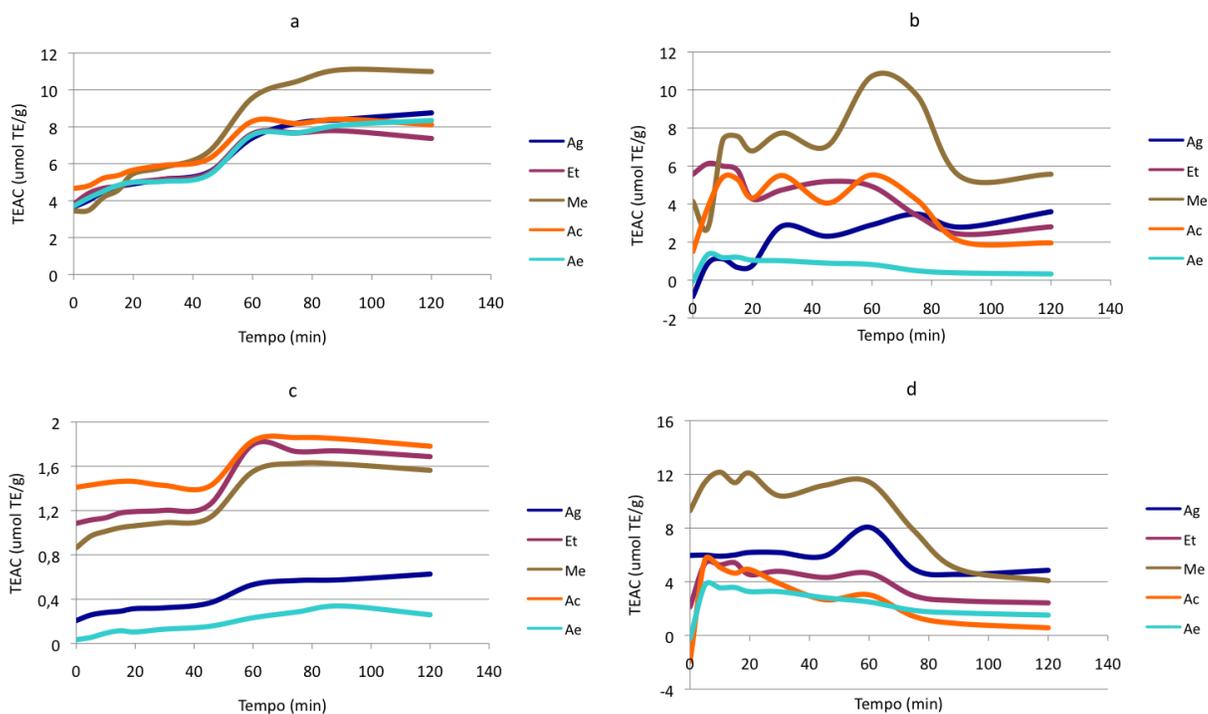


Figura 4.3: Cinética da capacidade antioxidante (TEAC) em polpa e amêndoa de macaúba. a: extrato concentrado da polpa; b: resíduo da polpa; c: extrato concentrado da amêndoa; d: resíduo da amêndoa.

Walker e Everette (2009) estudaram o comportamento cinético de vários antioxidantes em reação com o radical ABTS. Foi observado que a maioria dos compostos antioxidantes apresentaram um padrão cinético complexo ao reagir com o ABTS. Compostos usualmente empregados como padrão em reações de oxidação, e.g., Trolox, ácido ascórbico e ácido gálico, foram os que se estabilizaram mais rapidamente. Compostos que possuem um grupo tiol livre, cisteína, cisteamina e MPG (N-(2-mercaptopropionil)glicina), reagiram

mais rapidamente com o radical ABTS, enquanto ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e quercetina apresentaram os maiores tempos de reação, sem atingir a estabilidade ao fim de 60 minutos de análise.

O comportamento cinético de diversos compostos antioxidantes, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e tocoferóis também foi estudado por Pérez-Jimenez e Saura-Calixto (2008). Neste caso, observou-se que o ácido ferúlico apresentou o maior tempo de reação para atingir a estabilidade, seguido de resveratrol e dos ácidos tânico e gálico, com tempo de reação variando de 10 a 14 minutos. Ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol reagiram mais rapidamente com o radical ABTS, em intervalos de tempo menores que 2 minutos. Os resultados da cinética da reação dos compostos extraídos de polpa e amêndoa de macaúba indicam a existência de maior concentração de compostos antioxidantes com elevado tempo de reação, como alguns ácidos fenólicos e flavonoides, e menor concentração de compostos antioxidantes que se estabilizam rapidamente, como tocoferóis e ácido ascórbico, que provavelmente sofreram degradação durante o processo de extração.

A análise dos valores TEAC para cada amostra revela que foram extraídos compostos com poder antioxidante da polpa e amêndoa de macaúba. A extração feita com metanol na polpa resultou em maior capacidade antioxidante, medida pelo valor TEAC, e este também foi o solvente que resultou em maior capacidade antioxidante nos compostos retidos no resíduo. Os resíduos obtidos com água e acetato de etila foram os que apresentaram menor

capacidade antioxidante no resíduo. A extração de compostos antioxidantes da amêndoa pela metodologia adotada não foi eficaz, uma vez que a maior parte da capacidade antioxidante foi detectada no resíduo.

O extrato metanólico da polpa foi o que apresentou maior poder antioxidante ( 9,6  $\mu\text{mol/g}$ ), no entanto este valor ainda é bem mais baixo que a capacidade antioxidante encontrada em outras frutas, como acerola (38 a 65  $\mu\text{mol/g}$  de polpa), goiaba (30 a 38  $\mu\text{mol/g}$  em base úmida) e camu-camu (153  $\mu\text{mol/g}$ ), mas comparável a outros frutos, como cajá (7,8  $\mu\text{mol/g}$ ), açaí (15,1  $\mu\text{mol/g}$ ), mangaba (10,8  $\mu\text{mol/g}$ ) e tamarindo (8,3  $\mu\text{mol/g}$ ) (Mezadri et al., 2008; Thaipong et al., 2006; Almeida et al., 2011; Rufino et al., 2010).

#### **4.3.4 ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)**

Os extratos concentrados obtidos da polpa e amêndoa de macaúba apresentaram valores ORAC superiores aos encontrados nos respectivos resíduos. Ao comparar as extrações realizadas com diferentes solventes, foram obtidos resultados correlatos aos resultados encontrados para fenóis totais e flavonoides. O extrato etanólico obtido de amêndoa de macaúba foi o que apresentou a maior capacidade antioxidante e, para a polpa, o extrato metanólico foi o de maior eficiência (Tabelas 4.4 e 4.5).

Isabelle et al. (2010) conduziram um estudo em Singapura onde foi determinada a capacidade antioxidante pelo método ORAC em diversas frutas do

Tabela 4.4: Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em amêndoa de macaúba.

Amostra	ORAC <sup>a</sup> $\mu\text{mol TE/g}$	ORAC <sup>b</sup> $\mu\text{mol TE/g}$	Concentração $\text{mg/mL}$	Coefficiente angular	Coefficiente linear	R <sup>2</sup>
Extrato concentrado						
Ag	6,9±0,8	21±3	15 - 5	0,418	0,035	0,997
Et	23± 2	71±4	15 - 5	1,946	-2,243	1,000
Me	12,1±0,5	63±12	20 - 5	1,341	4,662	0,999
Ac	11,8±0,6	49±2	15 - 5	1,520	-0,411	1,000
Ae	5,2±0,2	36±1	20 - 10	1,188	-1,319	0,991
Resíduo						
Ag	1,8±0,9	17±7	10 - 3	0,605	3,431	0,971
Et	2,7±0,2	9±1	10 - 3	0,788	3,845	1,000
Me	17± 1	27±2	10 - 4	1,242	3,355	0,997
Ac	3,1±0,8	9±2	10 - 4	1,047	0,981	1,000
Ae	1,4±0,6	8±3	20 - 6	0,900	0,178	0,993

<sup>a</sup> Resultado expresso por massa de fruta fresca.

<sup>b</sup> Resultado expresso por massa de extrato seco.

comércio local extraídas com água. Houve grande variação entre as amostras, frutas como carambola, morango e sapoti foram as que apresentaram maior valor ORAC (entre 30 e 48  $\mu\text{mol TE/g}$  fruta fresca) e melão, melancia e mamão papaya apresentaram menores valores, cerca de 2  $\mu\text{mol TE/g}$ . A polpa de macaúba apresenta valores intermediários de capacidade antioxidante (19  $\mu\text{mol TE/g}$ ), comparáveis a frutos como uva, laranja e mangostão (Isabelle et al., 2010). Thaipong et al. (2006) encontraram em média 21,3  $\mu\text{mol TE/g}$  para goiaba. Cao et al. (1996) encontraram grande variação para valores ORAC em estudo com diferentes vegetais. Em base úmida, os maiores valores encontrados foram para alho e espinafre, 19,4 e 12,6  $\mu\text{mol TE/g}$ , respectivamente.

Tabela 4.5: Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em polpa de macaúba.

Amostra	ORAC <sup>a</sup> μmol TE/g	ORAC <sup>b</sup> μmol TE/g	Concentração mg/mL	Coefficiente angular	Coefficiente linear	R <sup>2</sup>
Extrato concentrado						
Ag	19,1±0,8	225±10	2 - 0,75	9,735	-0,708	0,997
Et	14,7±1,4	186±17	1 - 0,5	5,574	1,298	0,999
Me	36,3±2,6	315±11	1 - 0,5	9,484	3,086	0,991
Ac	16,6±1,2	261±19	1 - 0,5	12,798	-0,185	1,000
Ae	18,1±0,9	206±11	2 - 0,75	8,677	3,121	0,996
Resíduo						
Ag	6,5±0,4	51±3	5 - 2	1,837	3,713	0,993
Et	3,5±0,3	27±2	10 - 3	1,332	1,999	0,996
Me	16,0±3,5	63±14	3 - 1	3,042	3,141	0,989
Ac	8,9±0,6	60±4	5 - 2	2,586	3,127	0,995
Ae	5,7±0,4	35±3	5 - 1	1,545	3,855	0,998

<sup>a</sup> Resultado expresso por massa de fruta fresca.

<sup>b</sup> Resultados expresso por massa de extrato seco.

A Tabela 4.6 mostra os valores ORAC medidos em diferentes padrões de compostos antioxidantes e algumas vitaminas comerciais. A capacidade antioxidante adquirida com o consumo de um miligrama de seu extrato aquoso liofilizado, pode ser comparada à capacidade antioxidante de padrões antioxidantes e suplementos nutricionais. Dentre os ácidos fenólicos, o ácido caféico se destaca, com valor ORAC de 40,4 μmol TE/mg, contra 1,6 μmol TE/mg presentes no ácido ursólico. O extrato aquoso de polpa de macaúba apresentou 0,22 μmol TE/mg, valor que pode ser comparado ao de alguns suplementos nutricionais, como vitaminas do complexo B, polivitamínicos e minerais, e cápsulas de licopeno.

Tabela 4.6: Trolox equivalente e parâmetros de linearização para ORAC em padrões e vitaminas comerciais.

Amostra	ORAC $\mu\text{mol TE/mg}$	Concentração $\text{mg/mL}$	Coefficiente angular	Coefficiente linear	$R^2$
Padrão					
Epigallocatequina	20,0 $\pm$ 0,8	0,05 - 0,005	664,68	1,511	1,000
Ácido ursólico	1,6 $\pm$ 0,1	0,5 - 0,05	44,14	1,308	0,997
Ácido gálico	13,3 $\pm$ 1,0	0,07 - 0,03	529,19	2,383	0,998
Naringina	26,8 $\pm$ 4,2	0,04 - 0,01	811,97	7,051	1,000
Quercetina	20,6 $\pm$ 4,0	0,08 - 0,04	374,49	7,051	0,998
Ácido ferúlico	29,6 $\pm$ 2,5	0,03 - 0,01	970,83	6,126	0,999
Ácido cafeico	40,4 $\pm$ 8,0	0,03 - 0,01	995,32	14,021	0,995
Ácido ascórbico	9,9 $\pm$ 0,1	0,05 - 0,005	360,02	4,388	1,000
$\beta$ -caroteno	1,5 $\pm$ 0,1	0,5 - 0,2	63,46	1,100	0,999
Produtos comerciais					
Complexo B	0,38 $\pm$ 0,05	2 - 0,5	10,809	6,506	0,993
Vitamina E	0,05 $\pm$ 0,01	5 - 1	1,519	4,262	0,997
Licopeno	0,16 $\pm$ 0,04	5 - 1	5,605	6,159	0,999
Polivitamínico e mineral 1	0,55 $\pm$ 0,06	1 - 0,05	20,702	4,514	0,992
Polivitamínico e mineral 2	0,66 $\pm$ 0,14	1 - 0,1	30,416	3,308	0,993
Vitamina C	1,89 $\pm$ 0,56	1 - 0,2	41,944	16,746	0,987
Biotina	0,041 $\pm$ 0,006	10 - 3	1,125	6,631	0,997
Extrato aquoso da polpa de macaúba	0,22 $\pm$ 0,01	2 - 0,75	9,735	-0,708	0,997

### 4.3.5 Correlações

Os resultados das análises realizadas foram correlacionados estatisticamente utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson<sup>1</sup> ( $R$ ). A correlação entre os diferentes testes foi determinada, separadamente, para cada porção da fruta e também para as frações de extrato concentrado e resíduo. O coeficiente de correlação entre as medidas relacionadas à capacidade antioxidante realizada pelos diferentes métodos, tanto para os extratos concentrados quanto para os resíduos foi positivo e significativo ( $p \leq 0,05$ ) (Tabelas 4.7 e 4.8). Há uma maior correlação entre os métodos TEAC e ORAC em relação à concentração de fenólicos totais para o extrato concentrado da amêndoa de macaúba (0,90 e 0,87, para TEAC e ORAC, respectivamente) quando comparado ao seu resíduo (0,74 para TEAC e ORAC). No extrato concentrado a menor correlação foi entre os valores TEAC e ORAC, 0,78 para a amêndoa e 0,69 para a polpa. Dudonné et al. (2009) também encontraram menor correlação entre ORAC e outros métodos usados para medir a capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP), apesar do valor ORAC ter boa correlação com a concentração de fenóis totais. Esta menor correlação do valor ORAC com outros métodos foi atribuída ao fato dos resultados obtidos através do ORAC considerarem a cinética da reação antioxidante. A partir dos dados obtidos para a correlação entre os ensaios é possível concluir que a concentração de

---

<sup>1</sup>O coeficiente de correlação linear de Pearson ( $R$ ) pode variar de -1 a 1. Valores maiores que 0,90 indicam correlação positiva muito forte e valores entre 0,60 e 0,90 indicam correlação positiva forte. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) avalia a qualidade do ajuste da função, e seu valor é calculado a partir do quadrado do coeficiente linear ( $R$ ) (Lira, 2004).

Tabela 4.7: Coeficiente de correlação linear entre os testes realizados na amêndoa de macaúba.

	Fenóis totais	Flavonoides	TEAC	ORAC
Extrato concentrado				
Fenóis totais	1			
Flavonoides	0,91	1		
TEAC	0,90	0,95	1	
ORAC	0,87	0,84	0,78	1
Resíduo				
Fenóis totais	1			
Flavonoides	0,77	1		
TEAC	0,74	0,87	1	
ORAC	0,74	0,98	0,81	1

fenóis totais e flavonoides em extratos vegetais está relacionada à capacidade antioxidante das amostras.

#### 4.3.6 Atividade antimicrobiana

Os extratos fenólicos de polpa de macaúba não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhum dos microrganismos testados na concentração final de 10 mg/mL. Michelin et al. (2005) investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas em diferentes microrganismos. Romã (*Punica granatum*) apresentou atividade antimicrobiana para as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (6.4) nas concentrações de 25 e 40 mg/mL, respectivamente, e não apresentou atividade para as cepas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Extrato de jambolão não apresentou atividade antimicrobiana para nenhum

Tabela 4.8: Coeficiente de correlação linear entre os testes realizados na polpa de macaúba.

	Fenóis totais	Flavonoides	TEAC	ORAC
Extrato concentrado				
Fenóis totais	1			
Flavonoides	0,93	1		
TEAC	0,78	0,72	1	
ORAC	0,88	0,80	0,69	1
Resíduo				
Fenóis totais	1			
Flavonoides	0,81	1		
TEAC	0,80	0,91	1	
ORAC	0,80	0,87	0,74	1

destes microrganismos.

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões. No entanto, Aligiannis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; inibição moderada - MIC entre 600 e 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e como fraca inibição - MIC acima de 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Desta forma, a atividade antimicrobiana não foi testada com concentrações maiores de 10  $\text{mg}/\text{mL}$  de extrato de macaúba.

## 4.4 Conclusões

As determinações da capacidade antioxidante em amêndoa e polpa de macaúba, pelos métodos TEAC e ORAC, mostraram-se comparáveis, e ambos

apresentaram boa correlação com a concentração de fenóis totais e flavonoides do fruto. A fração polpa possui maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, responsáveis pela ação antioxidante, similar a outros frutos brasileiros. Desta forma, a polpa de macaúba mostra-se viável para ser usada em diferentes produtos alimentícios, por ter alto valor nutricional, energético, presença de compostos bioativos, como tocoferóis, carotenóides, compostos fenólicos e potencial antioxidante; e, assim, ter um maior aproveitamento dos recursos desta palmeira, comum em diversas regiões do país, e suprir carências nutricionais de grande parte da população brasileira.

## Referências Bibliográficas

- Ali, S.; Kasoju, N.; Luthra, A.; Sharanabasava, H.; Sahu, A. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1-15).
- Aligianis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4168–4170.
- Almeida, M.; de Souza, P. H. M.; Arriaga, A.; do Prado, G.; Magalhães, C. E. C.; Maia, G.; de Lemos, T. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44:2155–2159.

- Buenger, J.; Ackermann, H.; Jentzsch, A.; Mehling, A.; Pfitzner, I.; Reif-  
fen, K. A.; Schroeder, K. R.; Wollenweber, U. (2006). An interlaboratory  
comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *International  
Journal of Cosmetic Science*, 28:135–146.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and  
common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:3426–  
3431.
- Chun, O. K.; Kim, D.; Smith, N.; Schroeder, D.; Han, J. T.; Lee, C. Y.  
(2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from  
fruit and vegetables in the American diet. *Journal of Science and Food  
Agricultural*, 85:1715–1724.
- Coimbra, M. C.; Jorge, N. (2012). Fatty acids and bioactive compounds of the  
pulp and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*),  
jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal  
of Science and Food Agricultural*, 92:679–684.
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. (2004). Extending Appli-  
cability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein)  
Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:48–54.
- Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J. (2009). Com-  
parative study of anioxidant properties and total phenolic content of 30

- plants extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(1768-1774).
- Ellof, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64:711–713.
- Ferreira, D. S.; Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. (2010). Compostos bioativos presentes em amora preta. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:664–674.
- Isabelle, M.; Lee, B.; Lim, M.; Koh, W. P.; Huang, D.; Ong, C. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*, 123:77–84.
- Kim, D. O.; Jeong, S. W.; Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81:321–326.
- Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynska-Swiglo, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:313–322.
- Kuskoski, E.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. (2005). Actividade antioxidante en polpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25:726–732.

- Lin, J.; Tang, C. (2007). Cover image Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101:140–147.
- Lira, S. A. (2004). Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 196p.
- Luthria, D. L.; Mukhopadhyay, S. (2006). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:41–47.
- Ma, X.; Wu, H.; Liu, L.; Yao, Q.; Wang, S.; Zhan, R.; Xing, S.; Zhou, Y. (2011). Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, 129:102–107.
- Matteo, V. D.; Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders*, 2:95–107.
- Mezadri, T.; Villano, D.; Fernandez-Pachón, M. S.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:282–290.

- Michelin, D. C.; Moreschi, P. E.; Lima, A. C.; Nascimento, G. G. F.; Paganelli, M. O.; Chaud, M. V. (2005). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15:316–320.
- Mukhopadhyay, S.; Luthria, D.; Robbins, R. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:156–162.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4619–4626.
- Péres-Jimenez, J.; Arranz, S.; Taberner, M.; Díaz-Rubio, M.; Serrano, J.; Goñi, I.; Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41:274–285.
- Péres-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F. (2008). Antioxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:185–191.

- Ramos, M. I. L.; Filho, M. M. R.; Hiane, P. A.; Neto, J. A. B.; Siqueira, E. M. A. (2008). Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (supl.):90–94.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231–1237.
- Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94:2319–2358.
- Rufino, M.; Alves, R.; de Brito, E.; Péres-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121:996–1002.
- Shui, G.; Leong, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97:277–284.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3):144–158.
- Thaipong, K.; Boonprakoba, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS and DPPH and FRAP and and ORAC

assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675.

Walker, R. B.; Everette, J. D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1156–1161.

Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555–559.

## Conclusões Gerais

A caracterização bioquímica da polpa e amêndoa de macaúba revela a presença de níveis significativos de algumas enzimas e de capacidade antioxidante decorrente da presença de ácidos fenólicos e flavonoides no fruto.

Dentre as enzimas pesquisadas, as que apresentaram atividade na polpa e amêndoa de macaúba são: lipase, pectinase, celulase e as enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase. Dentre estas destaca-se a lipase, por seu crescente interesse científico e comercial devido às diversas aplicações tecnológicas que essa enzima oferece.

A caracterização do extrato lipolítico bruto revela que a lipase de polpa de macaúba é uma enzima estável em solventes orgânicos, com especificidade para ácidos graxos de cadeia longa saturados ou monoinsaturados, e com possibilidades de aplicações na síntese de ésteres. É uma lipase ácida, com atividade ótima em pH 5,5 e maior estabilidade na faixa de pH entre 6,0 e 7,0. Apresentou atividade máxima a 40 °C e estabilidade entre 25 e 40 °C.

O fruto da macaúba apresenta concentração intermediária de compostos fenólicos com capacidade antioxidante. Pode ser comparada a outros frutos da Amazônia e Cerrado brasileiros, com potencial nutritivo para ser melhor

explorado como fonte de alimento e renda para população regional, através do desenvolvimento de novos produtos que podem ser obtidos a partir do processamento de sua amêndoa e, principalmente da polpa.

Este estudo foi de grande importância para o conhecimento de novas características e propriedades de um fruto bastante comum no território brasileiro, mas ainda pouco explorado comercialmente. Agrega-se às informações já obtidas, como teor de ácidos graxos, carotenóides e tocoferóis, propriedades bioquímicas relevantes, como sua capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos, e atividades de enzimas com possibilidade de aplicação industrial.