

EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E
ESTERIFICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO LIPÁSICO DE SEMENTE
DE TRIGO (*Triticum aestivum*) APÓS CONCENTRAÇÃO COM SULFATO DE
AMÔNIO

EXTRACT AND EVALUATION ACTIVITY OF HIDROLISYS AND
ESTERIFICATION OF ENZYME LIPASYS EXTRACT SEED WHEAT
(*Triticum aestivum*) AFTER MERGER WITH AMONIUM SULFATE

Morgana Karin Pierozan*

morganapierozan@ideau.com.br

*Bióloga. Professora Doutora do Instituto de Desenvolvimento Educacional do
Alto Uruguai.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a otimização do processo de extração e caracterização parcial de lipases de semente de trigo (*Triticum aestivum*). A metodologia de planejamentos de experimentos mostrou-se eficiente para a maximização das condições avaliadas. Atividades hidrolíticas de 5,9U/g foram obtidas em granulometria de 35 mesh, razão sólido:solvente 30:60 em 15 horas de extração, atingindo 14,47U/g após concentração (24h) com sulfato de amônio (60%) e atividade específica de 0,64U/mg de proteína. Para a esterificação, atividades de 57,88U/g foram atingidas em granulometria de 35 mesh, razão sólido:solvente 30:120 em 5 horas de extração, passando para 208,20U/g após concentração (10h) de precipitação e atividade específica de 7,79U/mg de proteína.

Palavras-chaves: lipases, trigo, hidrólise, esterificação.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effects of particle size, solid:solvent ratio (w/v) and reaction time on hydrolytic and esterification activities of a lipase extract from wheat seeds (*Triticum aestivum*). The higher hydrolytic activity was 5.9U/g with a particle size

of 425 μ m, solid:solvent ratio of 30:60 (w/v) and reaction time of 15 hours, with maximum hydrolytic activity of 14.47U/g after 24 hours of precipitation using ammonium sulphate (60%) and specific activity of 0,64U/mg of protein. For esterification activity the best result was 57.88U/g with a particle size of 425 μ m, solid:solvent ratio of 30:120 (w/v) for 5 hours, with a maximum value after 10 hours of precipitation reaching 208.20U/g specific activity of 7,79U/mg of protein.

Key-words: lipases, wheat, hydrolysis, esterification.

INTRODUÇÃO

A aplicação de lipases em processos biotecnológicos tem sido objeto de grande interesse nos meios acadêmicos (engenharia de proteínas, enzimologia, agrárias, biológicas e etc.) e industriais nos últimos anos, pois sua regioseletividade, estereoespecificidade, especificidade pelo substrato e baixo consumo de energia são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases se tornem mais atrativos do que os processos convencionais não enzimáticos (BON et al., 2008; TREICHEL et al., 2010). Apesar de todas as vantagens citadas anteriormente, existem ainda problemas a serem resolvidos no desenvolvimento de processos para aplicação industrial destas enzimas, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção e purificação torna os processos enzimáticos mais caros (POLIZELLI, 2008).

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeias longas e insolúveis, embora também possam utilizar substratos de cadeia média ou curta, para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol, na interface lipídio-água, de sistemas biológicos (FROST e MOSS, 1987; FREIRE et al., 1997; RAJENDRAN e THANGAVELU, 2009; TREICHEL et al., 2010; BARROS et al., 2010).

Atualmente as lipases são produzidas ou obtidas, preferencialmente, a partir de micro-organismos, porém o uso de lipases vegetais pode ser considerado como uma alternativa às lipases microbianas. A extração e purificação parcial destes catalisadores

obtidos via extração de vegetais pode ser desenvolvida com técnicas simples, obtidas a partir de materiais de baixo custo e geralmente exibindo particular especificidade, além de serem tiposeletivas, o que pode ser vantajoso no enriquecimento específico em um tipo ou classe de ácidos graxos, além da sua facilidade de obtenção, abundância e pouca exploração (CARVALHO et al., 2003; BON et al., 2008).

Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e de óleos de sementes, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a germinação (MUKHERJEE, 1994). Segundo Barros et al. (2010) para estudar o processo de extração de lipases de sementes, primeiramente, deve-se compreender suas funções fisiológicas, bem como a sua atividade em produtos durante o armazenamento. Grãos em geral contêm proteínas e, dependendo da espécie vegetal, amido ou triacilgliceróis como fontes de reserva de energia. Na mobilização dessas três maiores reservas de nutrientes, durante a germinação, elas são hidrolisadas por proteases especificamente, amilases e lipases, respectivamente.

Com o intuito de intensificar a utilização de lipases vegetais em escala piloto e industrial, estudos com lipases de fontes vegetais, como sementes, látex, folhas e caule, têm crescido com o passar dos anos, sendo isoladas de alguns vegetais, tais como, arroz, canola, mamona, aveia e trigo. O trigo é um cereal do gênero *Triticum* spp., que compreende cerca de 24 espécies, das quais as mais extensivamente cultivadas são *T. aestivum* e *T. durum*. Representa o cereal mais importante na alimentação humana nas regiões de clima temperado, sendo cultivado no Brasil durante o inverno e a primavera (BOLLER, 1986; MUKHERJEE, 1994; FOGLIA, 1997; HASAN et al., 2006).

Estudos relacionados à lipases vegetais, mais precisamente lipase de semente de trigo, são raramente encontrados na literatura, pois, este assunto foi pouco desenvolvido no meio científico, especificamente sobre essa enzima. Sabe-se que a lipase de trigo foi isolada pela primeira vez em 1948, porém as características e propriedades dessa enzima, bem como sua estabilidade estrutural foram pouco estudadas. Entretanto, observam-se na literatura avaliações de atividade enzimáticas da lipase de gérmen de trigo (KAPRANCHIKOV et al., 2004).

A semente de trigo contém inúmeras vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas. Por essa razão, tem sido amplamente utilizada nas indústrias alimentícias,

médica e de rações. Contudo, seu uso integral é limitado pela sua instabilidade durante a estocagem, devido à presença de enzimas hidrolíticas e oxidativas (KAPRANCHIKOV et al., 2004). O alto conteúdo de lipases no gérmen de trigo resulta na liberação de ácidos graxos livres, os quais estão envolvidos numa cadeia de reações, levando ao aparecimento de rancidez no produto. Por essa razão, o problema da estabilidade desses produtos vem atraindo a atenção de muitos cientistas (ZYABLOVA, 2000).

O estudo das propriedades físico-químicas e dos mecanismos de ativação das lipases é um problema típico. A solução, possivelmente, gira em torno de pesquisas a fim de encontrar melhores maneiras de regular a atividade enzimática e desenvolver meios racionais para estabilizar a semente de trigo (KAPRANCHIKOV et al., 2004).

A etapa de concentração é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores níveis de atividade enzimática. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a obtenção do extrato enzimático bruto, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (MALDONADO, 2006). Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipases, sendo a precipitação de proteínas, geralmente, utilizada como uma primeira etapa para a purificação, utilizando-se o sulfato de amônio ou a cromatografia (de troca iônica ou interação hidrofóbica). Esses métodos também podem ser combinados para aumentar o poder de catálise das enzimas (SAXENA et al., 2003; GUPTA et al., 2004).

A precipitação com sulfato de amônio, geralmente, é o método mais empregado, por ser inofensivo para a enzima (usualmente utilizado na conservação enzimática). Esta metodologia consiste na separação das proteínas dos outros compostos interferentes do meio. A concentração pela adição de sais baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação (faixa de 40 a 90%) em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação; no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4°C). A adição do sal deve ser lenta e realizada sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação, o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (BORZANI et al., 2001; RIGO, 2009).

Como qualquer método de precipitação, a adição de sais, como o sulfato de amônio, não é muito seletiva e geralmente o extrato final não apresenta pureza elevada, o que limita o uso desse método. Contudo, é útil como uma etapa inicial de concentração, já que a proteína precipitada pode ser prontamente dissolvida em uma pequena quantidade de água (ILLANES, 2008; BON et al., 2008).

As atividades lipásicas, atividades enzimáticas específicas e fatores de purificação, após as precipitações com sulfato de amônio, relatadas na literatura, variam muito de acordo com as condições experimentais de precipitação e a fonte de enzima empregada. Contudo, os fatores de purificação observados são em geral menores que 10, mesmo em condições otimizadas (SMANIOTTO et al., 2010).

Independente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a pré-purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica, mantendo o aumento sempre dentro de uma faixa (KOBLOITZ, 2003). Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação (MALDONADO, 2006). Desta forma, neste estudo, utilizou-se lipases de fontes vegetais obtidas a partir da semente de trigo (*Triticum aestivum*), tendo como objetivo estabelecer o processo de extração e concentração do extrato enzimático de lipases com sulfato de amônio avaliando atividades de hidrólise e síntese.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As sementes de trigo (*Triticum aestivum* – Embrapa/Guamirim) foram doadas pela Empresa de Sementes Estrela de Erechim – RS (Brasil) partindo de um único lote e estocadas a 4°C até a utilização. Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Métodos

Seleção do método de extração e solvente para a lipase de semente de trigo

Para extrair e otimizar a atividade hidrolítica e de esterificação da lipase de semente de trigo, foram testados três diferentes protocolos baseados em avaliações realizadas pelos seguintes autores: método I, Ncube et al. (1995); método II, Sagioglu e Arabaci, (2005) e método III, Cavalcanti et al. (2005), conforme metodologia descrita abaixo.

No método I, 50g de semente de trigo permaneceram mergulhados em água destilada por 15 horas, em geladeira, sob agitação. Após este período a amostra foi filtrada em funil de Buchner, triturada em almofariz com 200mL de tampão fosfato de sódio 100mM e pH 7,0 e novamente filtrada. Posteriormente, o filtrado foi centrifugado a 1000xg por 5 minutos e o sobrenadante centrifugado novamente a 20.000xg por 30 minutos, para ser filtrado em bomba a vácuo e seguir para medida de atividade.

No método II, 10g de semente de trigo trituradas permaneceram mergulhadas em diferentes solventes (hexano, éter de petróleo, acetona, butanol e etanol) sob agitação e banho de gelo por 30 minutos. Em seguida as amostras foram filtradas e o procedimento foi novamente repetido. O extrato em pó obtido foi mantido em capela de exaustão para evaporação dos solventes. Posteriormente adicionou-se 80mL de tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 com CaCl 0,5mM em 20g do extrato em pó obtido, que permaneceu sob agitação por uma noite em geladeira. Posteriormente as amostras foram centrifugadas à 10.000xg por 30 minutos, filtradas em funil de Buchner com bomba a vácuo, sendo a atividade medida de atividade de hidrólise e esterificação a partir do extrato em pó obtido.

No método III, para a preparação do extrato em pó, 100g de sementes de trigo foram trituradas moimho de facas – Marconi MA – 340 e peneiradas em diferentes tamises para análises granulométricas de modo a obter partículas inferiores à 500mm. Em seguida foram adicionados 150mL de acetona a 4°C, e peneirados de modo a obter partículas inferiores à 500mm, sendo mantido em capela de exaustão para evaporação dos solventes. Ao extrato em pó foram adicionados mais 300mL de acetona à 4°C e manteve-se em agitação à 4°C por 16 horas, seguindo-se nova lavagem com 150mL de acetona à 4°C. O extrato em pó foi mantido em capela de exaustão por 24 horas para evaporação da acetona residual e, posteriormente, armazenado em geladeira até o momento da utilização.

Extração da lipase de semente de trigo

O procedimento utilizado para a extração da lipase de semente de trigo foi realizado conforme a metodologia descrita por Cavalcanti et al. (2005), método III, descrito anteriormente, com algumas modificações (LIAQUAT & OWUSU APENTEN, 2000; PIEROZAN et al., 2009). Nesta etapa, visando à otimização do processo de extração de lipase de semente de trigo foram avaliados os efeitos de diferentes granulometrias, solventes com diferentes polaridades e diferentes tempos de contatos entre a semente de trigo triturado e o solvente selecionado. Para tal, foi utilizada a técnica do planejamento de experimentos e análise por superfície de resposta.

Determinação da atividade de hidrólise do extrato enzimático

Foi utilizado como substrato azeite de oliva (5% p/v) emulsionado por três minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. Foram utilizadas 2g do extrato enzimático, agitando-se em agitador orbital por 15 minutos a 37°C e 150rpm. Decorrido o tempo, foram adicionados 20mL de solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos foram titulados com NaOH (0,04mol/L) até pH 11 (CAVALCANTI et al., 2005; PINHEIRO, 2006). Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, determinada através da Equação 1 (LEAL, 2000).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (1)$$

Onde:

A = atividade lipásica(U/mL);

V_a = volume da amostra titulada (mL);

V_b = volume do branco titulado (mL);

N = normalidade da solução de NaOH.

t = tempo de reação (minutos);

m = massa da amostra usada na reação (g);

Determinação da atividade de esterificação do extrato enzimático

A atividade de esterificação do extrato enzimático foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação entre este e n-propanol com razão molar ácido/álcool de 1:1 à temperatura de 40 °C, com a amostra a 5% (p/p) mantida sob agitação por 40 minutos.

A reação foi iniciada pela adição da amostra ao meio reacional, em um reator de vidro aberto, de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático à 40°C. Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero (sem amostra) e após 40 minutos de reação e diluídas em 20 mL de acetona/etanol (1:1 v/v) com a finalidade de cessar a reação. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01 mol/L até pH 11 (COSTA 2009; PIEROZAN, et al, 2009). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (FEIHRMANN, 2005). A atividade de esterificação foi calculada através da Equação 2.

$$A (U/g) = \frac{(V_0 - V_{40}).N. 1000.Vf}{t.m.Ve} \quad (2)$$

Onde:

N = normalidade da solução de NaOH;

V_0 = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_{40} = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min. de reação (mL);

m = massa de amostra utilizada na reação (g); t = tempo de reação em minutos;

Vf = volume final (mL);

Ve = volume da alíquota (mL).

Planejamento Experimental

Atividade de hidrólise

Primeiramente foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 , com triplicata do ponto central, avaliando os efeitos da granulometria das sementes (mesh), a razão sólido:solvente e o tempo de extração. Após avaliar estatisticamente as respostas obtidas nesse planejamento, foi desenvolvido um segundo planejamento experimental central rotacional com 2 fatores, a granulometria e o tempo. A razão sólido:solvente foi fixada em 30:60. As variáveis e níveis dos planejamentos experimentais realizados estão apresentados na Tabela 1, onde os códigos 1,41 (positivo e negativo) correspondem aos valores dos pontos axiais.

Tabela 1: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais utilizados no estudo da extração de lipase de semente de trigo para a atividade de hidrólise.

Variáveis	Níveis				
	Primeiro planejamento experimental				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Granulometria ($\mu\text{m}/\text{mesh}$)	-	1000/16	500/32	425/35	-
Razão sólido:solvente (p/v)	-	30:60	30:90	30:120	-
Tempo (h)	-	5	10	15	-
	Segundo planejamento experimental				
Granulometria ($\mu\text{m}/\text{mesh}$)	725/28	500/32	425/35	355/42	250/48
Tempo (h)	8	10	15	20	22

Atividade de esterificação

Foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 , com a utilização dos pontos axiais, tendo como variáveis a granulometria, razão sólido:solvente e o tempo. Esses fatores e seus níveis estão mostrados na Tabela 2.

Os resultados obtidos em termos de atividade de hidrólise e esterificação foram tratados estatisticamente pelo software Statistica 6.0.

Tabela 2: Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais para atividade de esterificação no estudo da extração de lipase de semente de trigo.

Variáveis	Níveis				
	Planejamento experimental				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Granulometria (mesh)	9	16	32	35	60
Razão sólido:solvente (p/v)	30:39,6	30:60	30:90	30:120	30:140,4
Tempo (h)	1.6	5	10	15	18.4

Concentração do extrato enzimático bruto

Precipitação com sulfato de amônio

Depois de otimizada a condição de extração, 120g do extrato enzimático bruto foram utilizados, juntamente com tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0) e sulfato de amônio até a saturação desejada (60%). Esta etapa foi realizada com agitador magnético em banho de gelo (4°C) com controle de pH (7,0) ajustado com adição de NaOH 20% até completa dissolução do sal. Após, a solução foi filtrada em gaze e o filtrado obtido foi então colocado em tubos de centrífuga de 50mL, permanecendo pelo tempo determinado no estudo à -10°C em um congelador para a precipitação da amostra. Para a determinação da melhor condição de concentração do extrato enzimático, foi utilizada a concentração de saturação em sulfato de amônio (60%) já descrita na literatura (ABIGOR et al., 2002; MENONCIN et al., 2008), variando-se somente o tempo de precipitação (5, 10, 15 e 24 horas).

Decorrido o tempo da precipitação, as amostras foram então centrifugadas a 8000rpm por 30 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 (SHU et al., 2006). As amostras foram então liofilizadas por 48 horas até peso constante, e mediram-se as atividades de hidrólise e esterificação para determinar qual a melhor condição de precipitação. Estas foram armazenadas em geladeira para posterior medida da quantidade de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a determinação do conteúdo de proteínas pelo método de Bradford foi utilizado Reagente de Bradford e uma curva padrão de albumina (1mg/mL).

Para a medida de proteína foi utilizada a seguinte metodologia: a amostra foi pesada (0,5g do extrato concentrado) e diluída em 1mL de água deionizada. A mesma foi agitada em vórtex e em seguida retirava-se uma alíquota de 100µL e diluía-se em 2,5mL de água deionizada. Novamente a mistura foi agitada em vórtex e foi retirada uma alíquota de 100µL. Adicionava-se 5mL do Reagente de Bradford, agitava-se em vórtex e a mistura foi deixada em repouso durante 2 minutos. Após esse período foram feitas as leituras em espectrofotômetro à 595nm. A concentração de proteína foi calculada conforme Equação 3:

$$[] \text{ Ptn} = \frac{\text{Abs}}{\text{Fator}} \cdot d \quad (3)$$

Onde:

[] Ptn = Concentração de proteína (mg prot./mL);

Abs = Absorbância lida nas amostras a 595nm;

d = Diluição das amostras;

fator = valor obtido na curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A literatura fornece metodologias aplicadas à extração e concentração de lipases, porém, percebe-se poucas informações relativas à estes parâmetros voltados à lipase de vegetais. Sendo assim, neste estudo buscou-se a obtenção de metodologias para a extração, bem como para a concentração parcial de extratos enzimáticos de sementes de trigo (*Triticum aestivum*).

Seleção do método de extração da lipase de semente de trigo

O parâmetro levado em consideração para escolha do método a ser utilizado na etapa de extração da lipase de semente de trigo foi o que apresentou a maior atividade hidrolítica, correspondendo ao método III, citado anteriormente. Os valores obtidos para esta seleção estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Seleção da metodologia para extração de lipase em função da atividade de hidrólise em (U/g).

Metodologia	Atividade enzimática de hidrólise (U/g)
Método I	0,48 ± 0,66
Método II	1,49 ± 1,26
Método III	5,86 ± 2,12

De acordo com os resultados observados na tabela acima, o método que apresentou a maior atividade hidrolítica foi o método III, porém, modificado por Pierozan et al. (2009), atingindo uma atividade hidrolítica de $5,86 \pm 2,12\text{U/g}$, sendo a atividade dos demais métodos testados neste estudo, inferiores a este valor.

A metodologia de extração da lipase de semente de trigo utilizada e avaliada pelo parâmetro de atividade hidrolítica (U/g) também foi utilizada para avaliação do parâmetro de atividade de esterificação (síntese).

Planejamento experimental

Atividade de hidrólise

Na consecução do primeiro planejamento experimental, a atividade de hidrólise do extrato obtido a partir de semente de trigo foi determinada em cada condição. As respectivas respostas estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4: Matriz do planejamento experimental completo 2^3 de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com as respostas da atividade hidrolítica da lipase da semente de trigo.

Experimento	Granulometria (μm)	Razão sólido:solvente (p/v)	Tempo (h)	At. Hidrólise (U/g)
				Semente de trigo
1	-1 (16)	-1 (30:60)	-1 (5)	0,72
2	+1 (35)	-1 (30:60)	-1 (5)	1,12
3	-1 (16)	+1 (30:120)	-1 (5)	0,85
4	+1 (35)	+1 (30:120)	-1 (5)	0,38
5	-1 (16)	-1 (30:60)	+1 (15)	2,53
6	+1 (35)	-1 (30:60)	+1 (15)	0,75
7	-1 (16)	+1 (30:120)	+1 (15)	1,23
8	+1 (35)	+1 (30:120)	+1 (15)	1,98

9	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	1,24
10	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	1,47
11	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	1,11

Através dos resultados obtidos, observa-se que o experimento 5 conduziu ao maior valor de atividade de hidrólise, seguido do experimento número 8. Também verifica-se que no ponto central os valores mostraram-se bastante próximos, demonstrando assim a reprodutibilidade dos experimentos.

Com esses valores, fez-se o tratamento estatístico e pôde-se constatar que, num nível de significância de 90%, as variáveis significativas foram o tempo e a interação da granulometria com a razão sólido:solvente. percebe-se que a razão sólido:solvente não apresentou efeito significativo, o que levou a fixar o seu valor no segundo planejamento experimental no mínimo que foi estudado neste 1º planejamento (30:60), tendo em vista, principalmente, um menor gasto de solvente orgânico.

Mesmo a granulometria não apresentando significância, o efeito da interação Granulometria x Razão sólido:solvente foi significativo e positivo. Analisando os resultados obtidos nesses experimentos e devido a estudos prévios (CAVALCANTI et al., 2007), decidiu-se continuar estudando os diferentes tamanhos das partículas para verificar o efeito desta variável. Desta forma, no 2º planejamento experimental, a variável granulometria teve seu nível deslocado para o maior nível estudado anteriormente (mesh 35).

Como o tempo apresentou um efeito positivo, decidiu-se estudar diferentes valores, todos próximos das 15 horas, devido às melhores respostas estarem nos experimentos que utilizaram este tempo e também por ser semelhante ao período (16 horas) utilizado para a extração de lipase de semente de mamona (*Ricinus communis* L.) (CAVALCANTI et al., 2007).

No desenvolvimento do segundo planejamento experimental, os resultados de atividade de hidrólise permitiram concluir que as maiores atividades hidrolíticas foram obtidas nas condições experimentais referentes ao ponto central. Essa resposta nos permite prever a proximidade das condições ótimas para a extração. Fez-se necessário então o estudo de pontos axiais para que o modelo empírico em termos de atividade

hidrolítica da lipase de semente de trigo fosse validado. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no 2º planejamento experimental completo, contendo dois fatores, totalizando 7 experimentos, com a adição das respostas para os pontos axiais.

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental completo 2² de 4 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) juntamente com os pontos axiais referentes à atividade hidrolítica da lipase de semente de trigo.

Experimento	Granulometria (µm)	Tempo (h)	At. Hidrólise (U/g)
1	-1 (32)	-1 (10)	1,44
2	+1 (42)	-1 (10)	4,40
3	-1 (32)	+1 (20)	1,37
4	+1 (42)	+1 (20)	0,60
5	0 (35)	0 (15)	4,85
6	0 (35)	0 (15)	5,26
7	0 (35)	0 (15)	5,90
8	-1,41 (28)	0 (15)	1,52
9	+1,41 (48)	0 (15)	0,63
10	0 (35)	-1,41 (8)	2,71
11	0 (35)	+1,41 (22)	0,63

Após a determinação das respostas de atividade de hidrólise mostradas na Tabela 4, os dados foram tratados estatisticamente pelo software Statistica 6.0 onde obteve-se um coeficiente de correlação de $R = 0,96$ a um nível de significância de 95%, e com um valor de F calculado (19,66) maior que o F tabelado (4,53), foi possível validando o experimento.

Os valores de atividades de hidrólise (5,9U/g) obtidos nestes experimentos são superiores aos obtidos em estudos de Kapranchikov et al., (2004), que foi de 0,195U/g em termos de atividade hidrolítica em suas melhores condições experimentais, embora estes autores tenham utilizado óleo de oliva purificado e polivinil álcool (PVS) na preparação da emulsão.

Devido à baixa quantidade de lipídios na constituição da semente de trigo, as atividades hidrolíticas foram significativamente baixas quando comparadas a sementes

que possuem alto teor de ácidos graxos. Exemplificando, Sagioglu e Arabaci (2005) encontraram uma atividade hidrolítica de 920U/g para a lipase de semente de girassol (*Heliantus annuus L.*). Já para Cavalcanti et al. (2007), a atividade de hidrólise para a semente de mamona (*Ricinus communis L.*) foi de 28U/g. Em um estudo sobre a lipase de arroz (*Oryza sativa*), que possui baixa concentração de lipídios, da mesma forma que o trigo, atividades hidrolíticas de 0,85U/g foram obtidas, valores relativamente inferiores aos obtidos neste estudo com o extrato bruto, apesar do ácido graxo hidrolisado ter sido a tributirina em emulsão com goma acácia (PRABHU et al., 1999).

Atividade de esterificação

Para a atividade de esterificação, realizou-se um planejamento experimental completo 2³, seguido de um ajuste por um modelo de segunda ordem utilizando a análise dos pontos axiais. A Tabela 6 apresenta os valores de atividade de esterificação determinados em cada condição estudada.

Analisando os resultados, concluiu-se que a melhor atividade foi de 57,88U/g, correspondendo à uma granulometria de 425µm (mesh 35), razão sólido:solvente de 30:120 e um tempo de reação de 5 horas. Esse resultado em relação à razão sólido:solvente já era esperado, pois quanto maior a quantidade de solvente, maior a superfície de contato dos grãos triturados com este solvente, facilitando a extração da enzima, e conseqüentemente, o tempo necessário para extração será menor.

Já para a granulometria, os resultados nos levam a concluir que quanto menor o tamanho da partícula, maiores serão os valores de atividades. Estes resultados também eram esperados, pois sendo uma enzima intracelular, quanto menor a granulometria utilizada, maior é a possibilidade de obtê-la, embora se tenha um limite no tamanho desta partícula. Como se pode observar no experimento 13 onde a granulometria era de 250µm (mesh 60), a atividade de esterificação foi menor em relação às atividades obtidas em granulometrias de 425µm (mesh 35), possivelmente porque em granulometrias muito pequenas há o predomínio da parte farinácea (amido) do grão de trigo.

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental completo 2³ de 8 ensaios mais 3 pontos centrais (codificados e reais) com adição dos pontos axiais referentes à atividade de esterificação da lipase de semente de trigo.

Experimento	Granulometria (mesh)	Razão sólido:solvente (p/v)	Tempo (h)	Atividade de Esterificação (U/g)
1	-1 (16)	-1 (30:60)	-1 (5)	7,06
2	+1 (35)	-1 (30:60)	-1 (5)	31,43
3	-1 (16)	+1 (30:120)	-1 (5)	19,53
4	+1 (35)	+1 (30:120)	-1 (5)	57,88
5	-1 (16)	-1 (30:60)	+1 (15)	29,16
6	+1 (35)	-1 (30:60)	+1 (15)	55,32
7	-1 (16)	+1 (30:120)	+1 (15)	23,41
8	+1 (35)	+1 (30:120)	+1 (15)	35,93
9	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	22,58
10	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	21,20
11	0 (32)	0 (30:90)	0 (10)	21,89
12	-1,68 (9)	0 (30:90)	0 (10)	7,60
13	+1,68 (60)	0 (30:90)	0 (10)	44,03
14	0 (32)	-1,68 (30:39,6)	0 (10)	10,98
15	0 (32)	+1,68 (30:140,4)	0 (10)	19,41
16	0 (32)	0 (30:90)	-1,68 (1,6)	31,39
17	0 (32)	0 (30:90)	+1,68 (18,4)	14,72

Embora exista certa variância entre as respostas apresentadas na Tabela 6, os valores de atividade de esterificação foram maiores quando comparados aos da atividade de hidrólise.

Pode-se observar que, independente da razão sólido:solvente, quanto menor o tamanho da partícula (maiores granulometrias) maiores serão os valores de atividade de esterificação. Esta constatação é bastante importante para este trabalho, pois esses resultados são considerados promissores, além de não ser encontrado na literatura nenhum estudo com essa enzima a respeito de análise de atividade de esterificação.

Os valores apresentados na Tabela 6 foram tratados estatisticamente a um nível de significância de 95%, onde obteve-se um bom coeficiente de correlação ($R=0,88$) o qual tornou possível a validação do modelo visto que o valor de F calculado (6,33) foi maior que o F tabelado (3,21).

Concentração do extrato enzimático bruto por precipitação em sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada a fim de obter a lipase da semente de trigo concentrada e conseqüentemente aumentar sua atividade hidrolítica e de esterificação. Como parâmetros para a extração, foram utilizados as condições otimizadas estudadas para atividade de hidrólise e esterificação, realizando-se posteriormente a concentração deste extrato. A saturação utilizada foi de 60% conforme descrito na literatura (ABIGOR et al., 2002; MENONCIN et al., 2008) em diferentes tempos de precipitação (5, 10, 15 e 24 horas). A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos antes e após a precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio.

Tabela 7: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação antes e após a precipitação do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio.

Experimento	Variável	Atividade de Hidrólise		Atividade de Esterificação	
		(U/g)		(U/g)	
	Tempo	Antes	Após	Antes	Após
	(h)	precipitação	precipitação	precipitação	precipitação
1	5	3,00	5,80	38,80	197,81
2	10	4,80	1,73	33,56	208,20
3	15	3,38	9,58	34,17	94,67
4	24	3,52	14,47	43,67	26,86

De acordo com os resultados apresentados acima, pode-se verificar que a maioria dos valores de atividade aumentaram após a precipitação, exceto no tempo de 10 horas para a atividade de hidrólise e de 24 horas para a atividade de esterificação.

Analisando somente a atividade de hidrólise, o melhor resultado foi obtido no experimento 4, onde a atividade aumentou de 3,52 para 14,47U/g, correspondendo a um aumento de mais de 4 vezes. Comparando esse resultado com o apresentado por Kapranchikov et al. (2004), o presente trabalho demonstrou um maior valor de atividade hidrolítica, visto que os autores obtiveram uma atividade de 5U/g para a precipitação com sulfato de amônio em presença de polietilenoglicol (PEG), com um grau de purificação de aproximadamente 3 vezes em relação ao extrato bruto.

Com relação à atividade de esterificação os melhores resultados foram observados nos menores tempos de precipitação, onde o maior valor foi de 208,20U/g em um tempo de 10 horas, correspondendo a um aumento de 6,2 vezes em relação à atividade antes da precipitação. Esses resultados são de grande importância, pois não foi encontrado nenhum estudo na literatura correspondente a concentração da lipase de semente de trigo avaliando a medida de atividade de esterificação.

A partir do extrato enzimático concentrado obtido, partiu-se para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e conseqüentemente o cálculo das atividades específicas dos extratos concentrados. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados em termos de atividade de hidrólise e esterificação (U/g) do extrato concentrado com sulfato de amônio, suas respectivas atividades específicas (U/mg de proteína) e fatores de purificação.

Tempo (h)	Atividade de hidrólise (U/g)	Atividade específica (U/mg prot.)	Fator de purificação	Atividade de esterificação (U/g)	Atividade específica (U/mg prot.)	Fator de Purificação
5	5,80	0,18	1,933	197,81	6,85	5,098
10	1,73	0,05	0,357	208,20	7,79	6,207
15	9,58	0,35	2,829	94,67	3,29	2,770
24	14,47	0,64	4,110	26,86	1,19	0,614

Observando os resultados apresentados na Tabela 8, nota-se que para a atividade de hidrólise, a melhor atividade específica foi no experimento correspondente à 24 horas de precipitação com sulfato de amônio, apresentando 0,64U/mg de proteína e 4,1 como fator de purificação em relação ao extrato enzimático bruto. Novamente comparando esses valores obtidos com a única literatura que também estudou a concentração da lipase de semente de trigo (KAPRANCHIKOV et al., 2004), o presente trabalho apresentou uma relativa superioridade aos 0,014U/mg de proteína obtido pelos referidos autores.

Para a atividade de esterificação, a maior atividade específica foi no experimento 2 (7,79U/mg de proteína) seguida do experimento 1 (6,85U/mg de proteína) e fatores de purificação de 6,207 e 5,098, respectivamente. Esses valores mostraram-se bastante próximos, confirmando assim que para se obter uma maior atividade no extrato concentrado, deve-se realizar esta etapa nos menores tempos estudados. Cabe ressaltar novamente que estas respostas apresentadas são inovadoras, pioneiras e promissoras para a atividade de esterificação da lipase de semente de trigo visto que não há nenhum estudo dessa natureza na literatura.

Comparando os resultados deste estudo em termos de fatores de purificação (4,1 para hidrólise e 6,2 para esterificação) com os de Rigo (2009), (1,48 vezes para uma lipase produzida por *Penicillium* sp. em fermentação sólida, nas mesmas condições) observa-se uma superioridade nos resultados apresentados neste estudo.

A precipitação de proteínas pela adição de sais é baseada na diminuição da sua solubilidade em altas concentrações de sal. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado, por ser inofensivo para a enzima (é usualmente empregado na conservação de enzimas) e bastante solúvel, o que proporciona forças iônicas suficientemente elevadas para precipitar quase todas as proteínas presentes no meio (ILLANES, 2008).

As atividades lipásicas, atividades específicas e fatores de purificação após a precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura variam muito de acordo com as condições experimentais empregadas. Contudo, os fatores de purificação observados são em geral menores que 10, mesmo em condições otimizadas (SMANIOTTO, 2010). Como qualquer método de precipitação, a adição de sais como o sulfato de amônio não é muito seletiva (ILLANES, 2008) e geralmente a preparação final não apresenta pureza

elevada, o que limita o uso desse método (BON et al., 2008). É, contudo, útil como uma etapa inicial de concentração, já que a proteína precipitada pode ser prontamente dissolvida em uma pequena quantidade de água.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o método de planejamento de experimentos foi eficiente para a otimização do processo de extração de lipase de semente de trigo, tendo para a atividade de hidrólise no extrato bruto de 5,9 U/g (Granulometria de mesh 35 (425 µm), 15 horas de extração e razão sólido:solvente 30:60) e de esterificação no extrato bruto de 57,88 U/g (Granulometria de mesh 35 (425 µm), 5 horas de extração e razão sólido:solvente 30:120). Após a concentração dos extratos brutos com sulfato de amônio percebeu-se um aumento 5,9 para 14,47 U/g, em 24 horas de precipitação à -10°C, com atividade específica de 0,64 U/mg de proteína (fator de purificação de 4) para a atividade de hidrólise e de 57,88 para 208,20 U/g, em 10 horas de precipitação à -10°C (aumento de 6 x) com atividade específica de 7,79 U/mg de proteína (fator de purificação de 6) para a esterificação.

Esses resultados são de grande importância, pois não foi encontrado nenhum estudo na literatura correspondente a concentração da lipase de semente de trigo avaliando a medida de atividade de esterificação.

REFERÊNCIAS

ABIGOR, R. D., UADIA, P. O., FOGLIA, T. A., HAAS, M. J., SCOTT, K.; SAVARY, B. J., Partial Purification and Properties of Lipase From Germinating Seeds of *Jatropha curcas*. L. **Journal of the American Oil chemist's Society**, vol. 79, p. 1123 2002.

BARROS, M.; FLEURY, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 27, p. 15 – 29, 2010.

- BOLLER, T.; **Plant Proteolytic Enzymes**; vol. 1; 1986.
- BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding; **Analytical Biochemistry**; vol. 72, p. 248-254; 1976.
- CARVALHO, P. O.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; Oliveira, J. G.; Shimizu, M. T., Silva, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, vol. 26, p. 75-80, 2003.
- CAVALCANTI, E. D. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R.; JÚNIOR, G. L. S.; Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors; **Brazilian Archives of Biology and Technology**; vol.48; p. 79-84; 2005.
- CAVALCANTI, E. D. C.; MACIEL, F. M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. C. A.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G.; Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L.; **Applied Biochemistry and Biotechnology**; vol.136-140; p. 57-65; 2007.
- COSTA, R. J. **Avaliação do processo de extração de lipases de semente de trigo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. URI – Campus de Erechim, Erechim – RS, 2009.
- FEIHRMANN, A. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim – RS, 2005.
- FOGLIA, T. A.; VILLENEUVE, P.; *Carica papaya* Latex-Catalyzed Synthesis of Structured Triacylglycerols; **Journal of the American Oil Chemists Society**; vol. 74; p.1447-1450; 1997.
- FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, R. L. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 81, p. 48-56, 1999.
- FROST, G. M.; MOSS, D. A.; *Production of enzymes by fermentation*; **Biotechnology Enzyme Technology**; vol. 7; p. 654; 1987.
- GUPTA, M. N. Enzyme function in organic solvents. **European Journal of Biochemistry**. vol. 203, p. 25-32, 1992.
- HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 235-251, 2006.
- KAPRANCHIKOV, V. S.; ZHEREBTSOV, N. A.; POPOVA, T. N.; Purification and characterization of lipase from (*Triticum aestivum* L.) germ; **Applied Biochemistry and Microbiology**; vol.40; p. 84-88; 2004.
- LIAQUAT, M.; OWUSU APENTEN, R. K.; Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media; **Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology**; vol.65, p. 295-299; 2000.

MALDONADO, R. R.; **Produção, Purificação e Caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**; Dissertação de Mestrado; UNICAMP; São Paulo; 2006.

MUKHERJEE, K. D.; Plant lipases and their application in lipid biotransformations; **Progress in Lipid Research**; vol.33; p.165-174; 1994.

NCUBE, I.; GITLESEN, T.; ADLERCREUTZ, P.; READ, J. S.; MATTIASSON, B.; Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed; **Biochimica et Biophysica Acta**; vol.1257; p. 149-156; 1995.

PIEROZAN, M. K.; COSTA, R. J.; ANTUNES, O. A. C.; OESTREICHER, OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 57, p. 9716 – 9721, 2009.

POLIZELLI, P. P. **Caracterização bioquímica de lipase extraída de sementes de oleoginosas de “*Pachira aquática*”**. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular). Ibilce – Instituto de Biosciência, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2008.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **LWT – Food Science and Technology**.; vol. 42, p. 985-992, 2009.

RAJESHWARA, A. N., PRAKASH, V. Purification and characterization of lipase from rice (*Oryza sativa* L.) bran. **Die Nahrung**. vol. 39, p. 406 – 418, 1996.

TREICHEL H, OLIVEIRA D, MAZUTTI M A, DI LUCCIO M, OLIVEIRA J V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**. vol. 3, p. 182-196. 2010.

ZYABLOVA, T.V.; **Development and Scientific Basis of Economic Storage of Wheat Germ; Cand. Sc. (Techn.)** Dissertation; Voronezh: Voronezhskaya gos. tekhnologich; 2000.

Agradecimentos: CNPq, UFRJ, IDEAU.