



CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE PRODUTOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE α -PINENO

C.H.C e SILVA¹, K.A.C VESPERMANN¹ e G. MOLINA¹

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia

E-mail para contato: carlos230697@gmail.com

RESUMO – Estudos de biotransformação de α -pineno vêm sendo amplamente realizados nos últimos anos, devido ao grande potencial biotecnológico da área na produção de compostos de aroma com maior valor agregado, especificidade e produção limpa. Deste modo, todo o processo deve ser mapeado e otimizado, do isolamento de novos microrganismos até a etapa de extração dos produtos do caldo fermentado após o período de biotransformação. Na literatura técnica encontra-se relatos acerca da influência do uso de diferentes solventes durante as etapas do processo, sendo observados resultados favoráveis à formação de produtos com o uso de determinados solventes bem como influências negativas quando utilizados outros tipos de solvente. Além disso, a etapa de extração é crucial para o processo de bioconversão como um todo, visto que é neste momento que os produtos são separados do caldo fermentado (que contém biomassa e outros subprodutos metabólicos) e podem ser utilizados. Neste intuito, a metodologia usual de extração encontrada na literatura foi utilizada para o teste de três diferentes solventes, sendo estes o Acetato de Etila, Éter Dietílico e Hexano, disponíveis no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do ICT/UFVJM. Com isso, as quantidades dos produtos extraídos foram obtidas através de cromatografia gasosa e os resultados analisados com a Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, utilizando o software STATISTICA 7.0.

1. INTRODUÇÃO

Os mono e sesqui-terpenos constituem-se em uma classe de compostos amplamente encontrados na natureza, estando dispostos em diversos tipos e em diferentes fontes. Além disso, estes compostos são os principais constituintes de óleos vegetais e possuem aplicação extensa na indústria de cosméticos e farmacêutica (Bicas et al., 2009). O monoterpreno α -pineno é o constituinte majoritário do óleo essencial de coníferas, sendo abundante também na terebintina, um resíduo das indústrias de papel e celulose (Lindmark-Henriksson, 2003).

A biotransformação de α -pineno em compostos de alto valor agregado vem sendo estudada há alguns anos. Por serem obtidos de forma biotecnológica, estes compostos podem ser caracterizados como “naturais”, o que aumenta o potencial mercadológico destes produtos. Além disso, o bioprocesso utilizado gera menor impacto ambiental e, também, uma



quantidade menor de resíduos. Porém, a alta toxicidade deste substrato para uma grande quantidade de linhagens microbianas, bem como sua baixa solubilidade em água e, consequentemente, menor disponibilidade no meio fermentativo, faz com que estudos de otimização nestes processos sejam constantes e extremamente necessários (Abolghasemi et al., 2013; Van Der Werf et al., 1997; Vespermann et al., 2017).

Porém, por serem substratos abundantes na natureza e possuírem baixo custo de obtenção, os monoterpenos surgem como potenciais substratos para a obtenção de uma série de produtos, como verbenol e α -terpineol, entre outros. Para isto, é necessária a obtenção de linhagens microbianas robustas o suficiente para que não só resistam à presença, mas também sejam capazes de utilizar esta classe de substratos como fonte única de carbono (Bicas et al., 2009; VESPERMANN et al., 2017).

Outra limitação relacionada a este processo está na etapa de extração dos produtos formados após a biotransformação. A complexidade do caldo fermentado bem como a baixa produção dos compostos de interesse faz com que a escolha do solvente ideal seja necessária para maximizar a extração destes compostos (Limberger et al., 2007). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de três solventes reportados na literatura em um bioprocessamento conduzido pelo grupo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de bioconversão foi conduzido com uma linhagem fúngica selvagem (LBA1323) do Banco de Microrganismos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos ICT/UFVJM, já avaliada quanto à sua capacidade de bioconversão de α -pineno (dados não demonstrados). Cinco pedaços de ágar com a cultura pré-crescida do fungo (72h de idade) foram transferidos para 150 mL de caldo Yeast Malt (YM; 0,5% peptona bacteriológica; 1% glicose; 0,3% extrato de levedura; água destilada), o material foi homogeneizado com Ultra-Turrax e, então incubado a 30°C, 150 rpm por 72h. A biomassa foi recuperada por filtração à vácuo utilizando funil de Buchner e papel filtro.

Para a biotransformação, 20 g/L (peso úmido) de biomassa recuperada na etapa anterior foi inoculada em 100 mL de meio mineral (MM; 0,5% MgSO_4 , 3% NaNO_3 , 1% K_2HPO_4 , 0,5% KCl , 0,01% Fe_2SO_4 , água destilada) contendo 2% (v/v) de α -pineno (Sigma Aldrich, 97% pureza) e então incubados a 30°C e 150 rpm por 96h.

Para preparo das amostras, foram retiradas alíquotas de 1 mL do caldo fermentado, após 72 e 96h, e colocada em Eppendorf. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solvente (acetato de etila, éter dietílico ou hexano) com posterior agitação em vórtex por 1 min. Depois, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 3000 rpm em microcentrífuga de bancada (Nova Instrument, NI1802) para separação de fases. Após este processo, o sobrenadante foi transferido para outro frasco eppendorf com adição de sulfato de sódio anidro seguida por nova agitação em vórtex para desidratação das amostras. N-decano (1% v/v; Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ de pureza) foi utilizado como padrão interno.

Para análise dos produtos formados e do substrato remanescente, um μL de amostra foi injetado em cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC-FID) 7820A (Agilent Technologies) acoplado com coluna HP-5 (30m de comprimento x 0,25 mm d.i. x

0,25 μm de espessura do filme). Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (1,0 mL.min⁻¹) e a temperatura do forno foi mantida a 80°C por 3 minutos, elevada até 200°C a uma taxa de 20°C/min e mantida por 4 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C..

Com o intuito de avaliar se houve diferença significativa entre as concentrações de produtos formados e substrato remanescente utilizando três solventes diferentes (acetato de etila, éter dietílico e hexano) foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, utilizando o software STATISTICA 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como os produtos não foram identificados e não foi possível a construção de uma curva de calibração utilizando padrões desses compostos, os valores de produção e consumo de produtos e substrato, respectivamente, estão expressos pela correlação (A_p/A_{pi}) entre a área de pico do produto formado (A_p) e a área de pico do padrão interno (A_{pi}), de modo a reduzir a expressão de erros inerentes à injeção de amostras.

Os produtos mais comuns derivados do processo de bioconversão de α -pineno, verbenol, mirtenol e pinocarveol, entre outros (Vespermann et al., 2017), possuem grupos funcionais polares expressivos em sua estrutura (-OH), indicando afinidade por solventes de caráter polar. Deste modo, pode-se inferir que os compostos encontrados têm alta probabilidade de possuírem grupos polares e, conseqüentemente, serem atraídos por solventes polares. Dentre os três compostos testados, o hexano caracteriza-se por ser um solvente apolar, enquanto os demais são polares, sendo o acetato de etila o mais polar entre os três (NIST, 2018).

A influência do solvente de extração na quantificação dos produtos formados durante a bioconversão e, conseqüentemente, na avaliação de viabilidade do bioprocessamento pode ser confirmada com os resultados obtidos por (Farooq et al., 2002). Neste estudo, diferentes produtos foram extraídos ao se utilizar proporções diferentes da mistura de acetato de etila e hexano (3:7 ou 2:3 v/v), o qual foi verificado através de análise cromatográfica. Para a primeira mistura, foi obtido o metabólito (-)-6 α -hydroxy- β -pinene, enquanto que a segunda mistura gerou os metabólitos (-)-4 β ,5 β -dihydroxy-B-pinene e (-)-2 β ,3 β -hydroxy-B-pinen-6-one. Deste modo, fica evidente o fato de que a mudança na composição do sistema de extração altera o comportamento químico dos compostos, fazendo com que diferentes produtos sejam extraídos para a fase orgânica.

Limberger et al. (2007) avaliou a influência dos solventes acetato de etila, clorofórmio e hexano na extração de produtos da biotransformação de α -pineno em verbenona. Durante seus experimentos, foi observado que o acetato de etila favorecia a formação de uma emulsão forte o suficiente para impedir o livre trânsito das moléculas de produto para a fase orgânica, descartando-se este solvente foi imediatamente nos estudos posteriores. Entre clorofórmio e hexano, este último apresentou melhores resultados na fase de extração, sendo o solvente escolhido pelos pesquisadores para o prosseguimento dos estudos em decorrência deste propiciar maior vida útil da coluna do cromatografo gasoso.



No presente estudo, contudo, não foi encontrada diferença estatística (Análise de Variância a 5% de significância) entre as extrações de cada produto (TR5.91, TR7.42 e TR7.50) pelos três diferentes solventes, tanto nas amostras de 72 horas (Tabela 1), quanto nas de 96 horas (Tabela 2). O comportamento foi o mesmo para todos os produtos avaliados e também para o substrato remanescente, indicando que ambos os solventes podem ser utilizados para a extração de α -pineno e seus produtos derivados a partir de processo fermentativo com a linhagem fúngica LBA1323.

Tabela 1 - Extração com diferentes solventes dos produtos formados a partir de α -pineno após 72 de processo fermentativo.

Solvente	Compostos Analisados			
	Pineno	TR5.91	TR7.42	TR7.50
Acetato de etila	0,4962 \pm 0,0597	0,0324 \pm 0,0091	0,0304 \pm 0,0137	0,0141 \pm 0,0027
Éter dietílico	0,4634 \pm 0,0582	0,0347 \pm 0,0050	0,0306 \pm 0,0116	0,0123 \pm 0,0012
Hexano	0,4970 \pm 0,0416	0,0384 \pm 0,0042	0,0398 \pm 0,0153	0,0151 \pm 0,0014

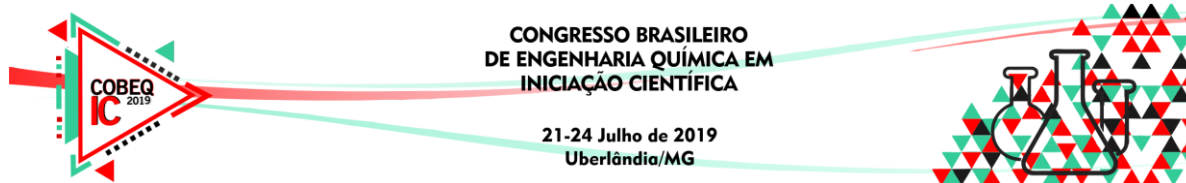
Tabela 2 - Extração com diferentes solventes dos produtos formados a partir de α -pineno após 96 de processo fermentativo.

Solvente	Compostos Analisados			
	Pineno	TR5.91	TR7.42	TR7.50
Acetato de etila	0,1110 \pm 0,0112	0,0193 \pm 0,0030	0,0060 \pm 0,0024	0,0102 \pm 0,0039
Éter dietílico	0,1010 \pm 0,0121	0,0184 \pm 0,0051	0,0055 \pm 0,0015	0,0097 \pm 0,0038
Hexano	0,1067 \pm 0,0091	0,0247 \pm 0,0052	0,0077 \pm 0,0014	0,0123 \pm 0,0045

Deste modo, ficou evidente que o melhor solvente para a extração de produtos de bioconversão deve ser definido após a realização de testes que comprovem sua efetividade para a finalidade daquele estudo, visto que cada bioprocessos possui inúmeras especificidades e fatores que o tornam singular. Portanto, diferentemente dos estudos discutidos anteriormente, para o caso aqui relatado não houve diferença estatística na quantidade de produtos extraídos com a utilização dos diferentes solventes. Assim, os dados práticos foram desconsiderados como critérios de escolha. Logo, como uma série de estudos da literatura técnica da área apresenta em comum o uso do acetato de etila como solvente único, ou pelo menos um dos constituintes do sistema de extração, optou-se pela condução dos experimentos utilizando este composto como fase orgânica extratora, além do fato deste ser o solvente mais polar dentre os testados (Bicas et al., 2008; Bier et al., 2017; Molina et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Como observado nos testes estatísticos realizados, a mudança do solvente na etapa de extração dos produtos não apresentou mudança significativa na concentração final de nenhum dos três produtos encontrados, tanto para 72 quando para 96h. Este fato indica que, possivelmente, a estrutura dos produtos formados possui complexidade elevada capaz de suprimir o efeito da polaridade dos solventes que, teoricamente, indicou o acetato de etila



como o melhor solvente para a extração. Por não influenciar de forma significativa na extração dos produtos encontrados, a escolha do solvente se deu pelo fato de que, na literatura técnica da área, o acetato de etila é o solvente mais comum para a etapa de extração de produtos formados na bioconversão de α -pineno, apresentando resultados satisfatórios e confiáveis durante a performance destes estudos.

5. REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, Z.; HESHMATIPOUR, Z.; MEYBODI, M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms from citrus waste water of citrus processing plant of Kosarin Ramsar-Iran. *Annals of Biological Research*, v. 4, n. 11, p. 134–141, 2013.
- BICAS, J. L. et al. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 6, p. 1991–2001, 2008.
- BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: An approach for the flavor Industry. *Chemical Reviews*, v. 109, n. 9, p. 4518–4531, 2009.
- BIER, M. C. J. et al. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. *Fungal Biology*, v. 2, n. 2, p. 137–144, 2017.
- FAROOQ, A. et al. The microbial oxidation of (-)-beta-pinene by *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, v. 57, n. 7–8, p. 686–90, 2002.
- LIMBERGER, R. P.; ALEIXO, A. M.; FETT-NETO, A. G. Bioconversion of (+)- and (-)-alpha-pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 6–13, 2007.
- LINDMARK-HENRIKSSON, M. Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification. [s.l.] Mid Sweden University, 2003.
- MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. *Food Chemistry*, v. 174, p. 606–613, 2015.
- NIST. Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook. 2018. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/>>. Acesso em: 9 abr. 2018.
- VAN DER WERF, M.; DE BONT, J.; LEAK, D. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 55, p. 147–177, 1997.
- VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 5, 2017.