

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) CONTENDO ATIVIDADE LIPOLÍTICA.

F. A. Silva¹, W. Kopp¹, A. A. Mendes², R. L. C. Giordano¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

² Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química

E-mail para contato: eq.felipe.silva@gmail.com

RESUMO - A lipase de mamona (*Ricinus communis* L.) é uma alternativa simples e de baixo custo aos catalisadores químicos empregados na síntese de biodiesel. Lipases contidas na mamona foram processadas através da trituração de endospermas, seguido de incubação em acetona (1:5 m/v) por diferentes períodos gerando o chamado extrato bruto. A suspensão foi filtrada, lavada com acetona e peneirada após secagem a temperatura ambiente. O período de incubação e o número de lavagens com acetona refletiram diretamente na atividade obtida ao final do processo, sendo que o extrato bruto incubado por 4 horas apresentou a melhor atividade lipolítica. As lavagens subsequentes foram eficazes na remoção de ácidos graxos residuais, embora resultem na redução da atividade. Foi possível otimizar a produção de extrato bruto de mamona, resultando na obtenção de um biocatalisador de baixo custo e com alta atividade catalítica.

1. INTRODUÇÃO

O uso extensivo de combustíveis fósseis e a avançada deterioração do meio ambiente alavancaram a busca por tecnologias limpas e renováveis. Neste quesito, o biodiesel desponta como uma alternativa promissora aos tradicionais combustíveis fósseis (Ahmad, Yasin *et al.*, 2011).

O biodiesel é composto por ésteres de ácidos carboxílicos e possui propriedades químicas semelhantes às do diesel de petróleo. A rota mais utilizada para sua obtenção é a transesterificação (alcoólise) de óleos vegetais ou gordura animal com um álcool (por exemplo, etanol) realizada por catalise química ou bioquímica (enzimática) (Knothe *et al.*, 2006, Ranganathan *et al.*, 2008). Embora o uso de catalisadores químicos resulte em elevada conversão em reduzidos tempos de reação, seu uso requer equipamentos específicos e resistentes à corrosão, além de elevado consumo de água e energia (Lam *et al.*, 2010, Leung *et al.*, 2010).

Uma alternativa aos catalisadores químicos é o uso de enzimas como biocatalisadores. Enzimas possuem elevada efetividade catalítica; além de elevada especificidade frente a substratos e ausência de formação de co-produtos indesejáveis (Fernandes, Cabral 2010).

Contudo, os elevados custos envolvidos na produção e purificação ainda representam uma enorme barreira para aplicação de enzimas em escala industrial.

Enzimas vegetais são novidade em termo de fontes enzimáticas possuindo vantagens como baixo custo da matéria-prima, fácil aceitação no mercado devido sua natureza vegetal e possibilidade de aplicação direta como biocatalisadores mesmo quando parcialmente purificadas (Seth *et al.*, 2014). Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C 3.1.1.3) naturalmente catalisam a hidrólise de óleos e gorduras quando em meio aquoso de forma parcial ou total. Em meio orgânico são capazes de realizar reações de esterificação, transesterificação (alcoólise) e interesterificação de lipídeos (Atabani *et al.*, 2012, Adlercreutz 2013).

A lipase de mamona (*Ricinus communis* L.) se destaca entre as lipases vegetais devido a sua elevada atividade catalítica e baixo custo de obtenção. Diferentemente da maioria das sementes que requerem um período de germinação, sementes de mamona possuem enzimas de atividade lipolítica em sementes não germinadas (dormentes) (Eastmond 2004). Desta forma, sementes processadas de mamona podem ser utilizadas como biocatalisador em algumas reações químicas sem a necessidade de extensivos procedimentos de purificação. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar e otimizar algumas variáveis envolvidas na produção de um extrato de sementes de mamona com atividade lipolítica visando a obtenção de um biocatalisador eficiente e de baixo custo para aplicação na síntese de biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Sementes de mamona (*Ricinus communis* L) foram adquiridas da empresa BR SEEDS LTDA (Araçatuba – SP). Acetona, acetato de sódio tri hidratado, ácido acético glacial, ácido oleico, hidróxido de potássio utilizados foram fornecidos pela Synth (São Paulo, SP). A tributirina foi adquirida da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

Efeito do tempo de incubação sobre o extrato bruto de mamona: Os endospermas isentos de casca de sementes de mamona foram triturados em liquidificador por 2 minutos com 50 mL de acetona gelada (4 °C). Em seguida, adicionou-se acetona gelada ao triturado gerando uma proporção semente de mamona/acetona de 1:5 (m/v). O material foi incubado sob agitação constante a 4 °C, e amostras foram retiradas em intervalos de tempos regulares por um período de 24h.

As amostras coletadas foram filtradas a vácuo e mantidas a temperatura ambiente para a evaporação da acetona residual. Uma vez seca, cada amostra foi triturada individualmente em almofariz, peneirada em malha 0,85 mm e armazenada. Esse material foi chamado de extrato bruto.

Efeito do número de lavagens sobre o extrato bruto de mamona: O material foi preparado seguindo a mesma metodologia descrita no item anterior. Após incubação por 4 horas, alíquotas do material foram filtradas a vácuo e lavadas sucessivamente com acetona

gelada. Cada amostra individual do material foi mantida a temperatura ambiente para a evaporação da acetona residual. Uma vez seca por completo, as amostras foram trituradas em almofariz, peneiradas em malha de 0,85 mm e armazenadas.

Determinação da atividade lipolítica: A atividade lipolítica do extrato bruto de mamona foi determinada pelo método da hidrólise de tributirina, seguindo a metodologia descrita por Beisson *et al.*, (2000), com algumas adaptações. A mistura reacional composta de 14 mL de água destilada, 5 mL de tampão acetato 0.2 mol.L^{-1} pH 4.2 e 1 mL de tributirina foi mantida sob agitação mecânica em reator encamisado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos. Após a adição de 0,1g extrato bruto, o equipamento pHstato (pHstat Tritrino 718, Metrohm - Suíça) foi utilizado adicionar e controlar a quantidade de KOH 0.04 mol.L^{-1} adicionado ao meio reacional mantendo o pH do meio reacional em 4.5. A quantidade de ácido butanóico liberado no meio reacional foi quantificada através do volume consumido da solução de KOH 0.04 mol.L^{-1} . Uma unidade de atividade (U_{TBU}) foi definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de ácido butanóico por minuto nas condições experimentais. As medidas de atividade lipolítica foram realizadas ao menos em triplicata.

Avaliação espectrofotométrica: Foram coletadas amostras da acetona utilizada em cada uma das lavagens do extrato bruto. As amostras foram filtradas em membrana $0.22 \mu\text{m}$ (Millex, Merck Millipore) e submetidas a varredura espectrofotométrica entre 190 e 600 nm (Genesys 10 UV, Thermo Scientific).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um passo essencial para viabilizar a utilização do extrato bruto de mamona como biocatalisador é a extração do material graxo presente nas sementes de mamona, uma vez que a presença de lipídeos pode conduzir a formação de subprodutos indesejados em algumas reações de síntese, sobretudo para reações de síntese de químicos finos e produtos farmacêuticos (Seth *et al.*, 2014). Desta forma, a remoção dos lipídeos presentes na semente sem perda de atividade catalítica representa uma etapa crucial na preparação do extrato bruto de mamona. O teor de óleo nas sementes de mamona varia entre 45 – 50% (Santos 2010).

A Figura 1 mostra a influência do tempo de incubação em acetona sobre a atividade lipolítica de extrato bruto de mamona. É possível observar aumento da atividade lipolítica com o passar das primeiras horas de incubação, chegando ao ápice em 4 horas. Após 4 horas de incubação a atividade lipolítica começa a diminuir. O principal objetivo desta etapa de incubação de sementes de mamona trituradas em acetona é a retirada de lipídios que passam para a fase líquida. Desta forma a incubação em acetona diminui a concentração de lipídeos no extrato bruto aumentando a concentração relativa de carboidratos e proteínas, dentre as quais estão as lipases, e conseqüentemente aumentando a atividade lipolítica por grama de extrato bruto. Todavia, pode-se observar uma redução gradativa da atividade lipolítica conforme aumenta o tempo de incubação, muito provavelmente devido a inativação da enzima pela ação da acetona. Esses resultados apresentam um aprimoramento do extrato bruto obtido por Avelar *et al.*, (2013) e Santos *et al.*, (2013), cujos trabalhos não avaliaram o período ideal de incubação. Com base nesse experimento, adotou-se 4 horas com tempo ideal de incubação em acetona.

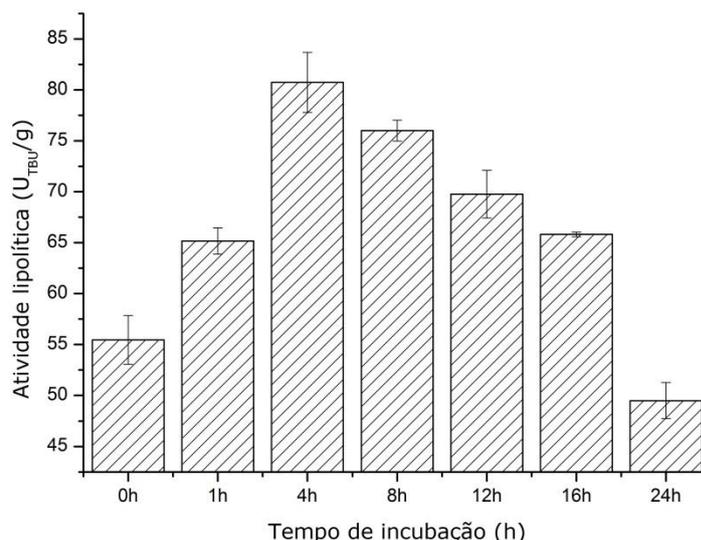


Figura 1 – Influência do tempo de incubação em acetona sobre a atividade lipolítica de extrato bruto de mamona. Atividade determinada por hidrólise de triburina em tampão acetato 0.2 mol.L⁻¹ pH 4.5 a 37 °C. Experimentos realizados em triplicata.

Em um experimento posterior, foi verificado o efeito do número de lavagens com acetona sobre a atividade hidrolítica da lipase. Embora o período de incubação seja eficiente para remoção do material graxo, lavagens subsequentes com acetona podem ser necessárias para remoção total dos lipídeos residuais. A Figura 2 apresenta o comportamento da atividade da lipase em função do número de lavagens efetuado. A primeira lavagem resulta em uma redução significativa da atividade do extrato bruto de mamona. É possível que além de ácidos graxos, a acetona utilizada esteja arrastando a água presente no extrato. Lipases atuam na interface água-óleo, de modo que uma quantidade mínima de água é necessária para manter a atividade catalítica e a integridade estrutural da enzima (Yan *et al.*, 2014).

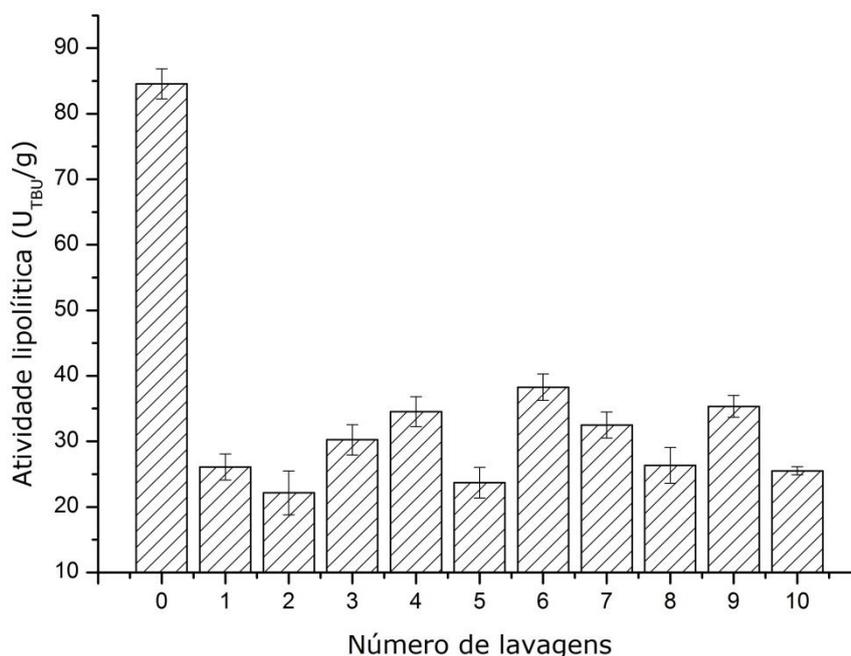


Figura 2 – Influência do número de lavagens a atividade hidrolítica de extrato bruto de mamona. Atividade determinada pela hidrólise de triburítina em tampão acetato 0.2 mol.L⁻¹ pH 4.5 a 37 °C. Experimentos realizados em triplicata.

Nota-se uma tendência de aumento da atividade até a sexta lavagem seguida de uma queda. O aumento observado na atividade após a segunda lavagem pode ser decorrência do aumento da concentração relativa de proteínas no extrato. Todavia, a partir da sétima lavagem, a acetona passa a ter um efeito deletério às lipases presentes no extrato, resultando na queda observada da atividade lipolítica.

Embora lipídeos apresentem fraca absorção quando expostos à radiação eletromagnética, é possível analisá-los em comprimentos de onda de 200 – 210 nm, em virtude da presença de ligações duplas e grupos funcionais como carbonila, carboxila, fosfato e amino (Gunstone *et al.*, 2012). Qualitativamente, amostras de acetona de cada lavagem aplicada ao extrato bruto passaram por uma varredura em espectrofotômetro a fim de verificar a possível remoção de material graxo residual. A título de comparação, foi avaliado também uma solução de ácido oleico 0.1 mol.L⁻¹ nas mesmas condições das amostras de lavagem. A Figura 3 apresenta os espectros obtidos.

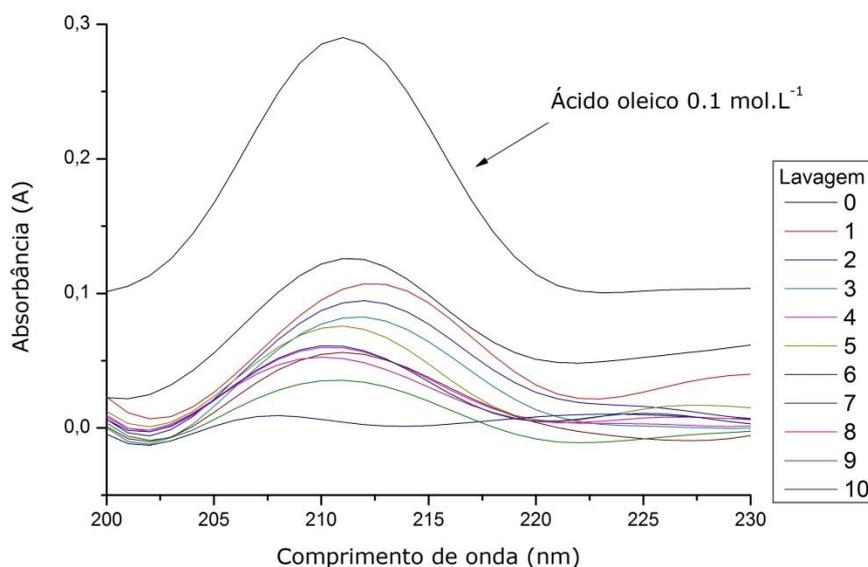


Figura 3 – Espectros de varredura das acetonas de lavagem extrato bruto de mamona e solução de ácido oleico 0.1 mol.L^{-1} .

A partir dos espectros, observa-se que após o período de incubação a concentração de ácidos graxos remanescentes é baixa. Esta concentração reduz conforme mais lavagens são aplicadas ao extrato bruto, chegando a ser insignificante na décima lavagem. Embora as lavagens posteriores à incubação sejam eficazes na remoção de ácidos graxos residuais, estas ocasionam uma perda de atividade considerável. Conseqüentemente, a utilização desta etapa só é justificada quando a presença de ácidos graxos - mesmo que em baixas concentrações - interfira nas condições do processo.

4. CONCLUSÃO

A lipase de mamona se mostra uma interessante alternativa biotecnológica aos catalisadores químicos empregados na síntese de biodiesel. Os resultados obtidos apontam que um período de incubação de 4 horas em acetona resulta num extrato bruto com elevada atividade catalítica. O processo lavagem pós-incubação com acetona removem os ácidos graxos residuais, embora ocasionem significativa perda de atividade lipolítica. A metodologia aplicada neste trabalho possibilita a obtenção de um biocatalisador de baixo custo e com alta atividade catalítica.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos recursos disponibilizados pelo CNPQ (CNPQ/Universal 483947/2012-1) e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

6. REFERÊNCIAS

- Adlercreutz, P. (2013). "Immobilisation and application of lipases in organic media." *Chemical Society Reviews* **42**(15): 6406-6436.
- Ahmad, A. L., N. H. M. Yasin, C. J. C. Derek and J. K. Lim (2011). "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**(1): 584-593.
- Atabani, A. E., A. S. Silitonga, I. A. Badruddin, T. M. I. Mahlia, H. H. Masjuki and S. Mekhilef (2012). "A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**(4): 2070-2093.
- Avelar, M. H. M., D. M. J. Cassimiro, K. C. Santos, R. C. C. Domingues, H. F. de Castro and A. A. Mendes (2013). "Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds." *Industrial Crops and Products* **44**(0): 452-458.
- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière and R. Verger (2000). "Methods for lipase detection and assay: a critical review." *European Journal of Lipid Science and Technology* **102**(2): 133-153.
- Eastmond, P. J. (2004). "Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans." *J Biol Chem* **279** (44): 45540-45545.
- Fernandes, P. and J. M. S. CABRAL (2010). *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*. W. Soetaert and E. J. Vandamme, Wiley-VCH: 522.
- Gunstone, F. D., J. L. Harwood and A. J. Dijkstra. *The Lipid Handbook*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007.
- Knothe, G., J. VAN GERPEN, J. Krahl and L. P. Ramos. *Manual de biodiesel*, São Paulo: Edgard Blücher, 2006.
- Lam, M. K., K. T. Lee and A. R. Mohamed (2010). "Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review." *Biotechnology Advances* **28**(4): 500-518.
- Leung, D. Y. C., X. Wu and M. K. H. Leung (2010). "A review on biodiesel production using catalyzed transesterification." *Applied Energy* **87**(4): 1083-1095.
- Ranganathan, S. V., S. L. Narasimhan and K. Muthukumar (2008). "An overview of enzymatic production of biodiesel." *Bioresource Technology* **99**(10): 3975-3981.
- Santos, H. O. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010. 85 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, K. C., D. M. J. Cassimiro, M. H. M. Avelar, D. B. Hirata, H. F. de Castro, R. Fernández-Lafuente and A. A. Mendes (2013). "Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils." *Industrial Crops and Products* **49**(0): 462-470.

Seth, S., D. Chakravorty, V. K. Dubey and S. Patra (2014). "An insight into plant lipase research - challenges encountered." *Protein Expr Purif* **95**: 13-21.

Seth, S., D. Chakravorty, V. K. Dubey and S. Patra (2014). "An insight into plant lipase research – challenges encountered." *Protein Expression and Purification* **95**(0): 13-21.

Yan, Y., X. Li, G. Wang, X. Gui, G. Li, F. Su, X. Wang and T. Liu (2014). "Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review." *Applied Energy* **113**: 1614-1631.