

Evaluación de las condiciones óptimas de lipasas extraídas de bola africana (*Leonotis nepetifolia*) para la remoción de aceite lubricante usado en el suelo

Mayra Luisa Contreras-Ramírez*, José Pablo Esparza-Del Río, Verónica Ávila-Vázquez, Miguel Mauricio Aguilera-Flores*.

Ingeniería Ambiental, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Bote 202 Cerro del Gato Ejido La Escondida, Col. Ciudad Administrativa 98160 Zacatecas, Zac., México.

* Autores de correspondencia: mcontrerasr1700@alumno.ipn.mx; maguileraf@ipn.mx. Tel.: (+52) 555-729-6000 Ext. 83562.

Contaminación de agua, suelo y aire (Tratamientos biológicos).

Palabras clave: actividad enzimática; biorremediación de suelos; lipasas.

Introducción. La contaminación por aceite lubricante usado es uno de los problemas más comunes que se presenta a nivel mundial, dado al manejo inadecuado de este residuo peligroso hacia el ambiente. Se estima que un litro de aceite lubricante usado puede contaminar hasta 3,784 m² de suelo, ocasionando que no sea productivo para el cultivo o el crecimiento de plantas por hasta 100 años (Chin *et al.*, 2012). A causa de esto, surge la necesidad de mitigar los efectos nocivos causados al ambiente por medio de tecnologías de remediación de suelos. Kumar y Bharadvaja (2019), mencionan que la biorremediación enzimática se ha convertido en una técnica de remediación alternativa a las convencionales, refiriéndose a enzimas naturales en microorganismos o plantas, con el fin de degradar contaminantes nocivos, indeseables y recalcitrantes. A pesar de que estos procesos son propuestas innovadoras, la información que se tiene es escasa referente a remediación de suelos. Sin embargo, diversos autores han determinado que la principal característica que presentan estas especies corresponde a la actividad enzimática de las lipasas de sus semillas (Santos *et al.*, 2013; Sánchez, 2019). La actividad enzimática en especies puede variar dependiendo de la composición de los ácidos grasos del sustrato lipídico y factores como pH y temperatura (Pérez y Alméjía, 2011). Para esto, se ha reportado que las semillas de *Leonotis nepetifolia* contienen un 37% de grasa, identificando ácidos grasos insaturados como lo son el oleico, labalénico y linoleico (Marrero *et al.*, 2015). Por lo que determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura de las lipasas extraídas de esta especie permitirá aprovechar al máximo su actividad enzimática para procesos de biorremediación de suelos.

Materiales y Métodos. Se recolectaron 80 g de semillas de bola africana. El extracto de lipasas se obtuvo mediante el método propuesto por Avelar *et al.* (2013) con algunas modificaciones, moliendo durante 10 minutos 40 g de las semillas con 50 mL de acetona fría (4°C), adicionando cada 2 min una relación 1:5 p/v. La pasta formada se mezcló bajo agitación magnética a 700 rpm y 4 °C durante 16 h. Una vez cumplido el lapso, se filtró al vacío, colocando el extracto recuperado en bandejas de aluminio durante 24 h. El extracto seco, se tamizó para obtener partículas menores a 1 mm y fue almacenado a 4°C hasta su uso. La actividad enzimática se determinó por hidrólisis de aceites emulsionados, de acuerdo con la metodología descrita por Santos *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. Para esto, se preparó la mezcla reacción adicionando 5 mL de emulsión (50 g de aceite de oliva comercial con 150 mL de una solución 30 g/L de goma arábiga), 5 mL de buffer en el rango de pH entre 5.0 y 8.0 (buffer acetato de sodio 0.01 M, pH 5.0 y buffer fosfato de sodio 0.01 M, pH 5.5-8.0) y 0.1 g de extracto en polvo de lipasa. La mezcla se incubó durante 5 min a 37 °C. La reacción se detuvo por adición de 10 mL de etanol y los ácidos grasos formados se titularon con solución de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. De igual manera se realizaron reacciones control, añadiendo el extracto de lipasa después de la adición del etanol. Finalmente, la actividad enzimática fue calculada a partir de la Ecuación 1 (Tavares *et al.*, 2018).

$$A = \frac{10^6 * (V - V_i) * M_{NaOH}}{t * m} \quad (1)$$

Donde A es la actividad enzimática (U/g); V es el volumen usado en la titulación (mL); V_i es el volumen usado en el blanco (mL); M_{NaOH} es la molaridad real de la solución (M); t es el tiempo de la reacción (min) y m es la masa exacta del extracto de lipasa (g). La actividad enzimática se definió una unidad de actividad de lipasa (U) como la cantidad de lipasa que producía 1 μmol de ácido graso por minuto en las condiciones del ensayo (Santos *et al.*, 2013).

Resultados. De las extracciones realizadas se obtuvo que por cada 1 g de semilla se recuperaron 0.4 g de extracto de lipasa. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1, en donde se determinó que el experimento con una mayor actividad enzimática corresponde a el pH de 8, presentando un valor de aproximado de 226.8±18.9 U, lo cual, muestra una clara diferencia respecto a los demás pH.

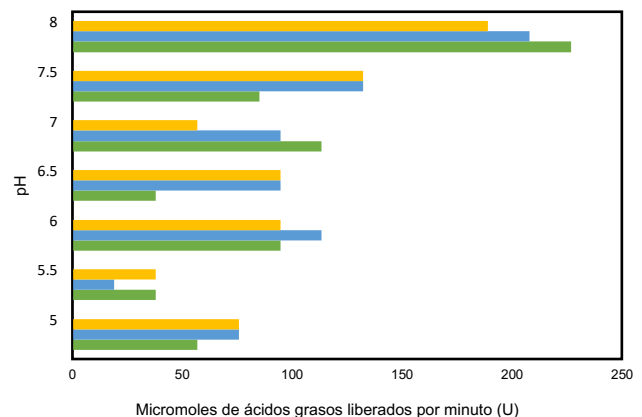


Figura 1. Unidades de actividad enzimática (U) del extracto en polvo de lipasa de acuerdo con cada pH.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se tiene que autores como Santos *et al.*, (2013), emplearon la misma metodología con la especie exótica-invasora Higuera (*Ricinus communis L.*), obteniendo una actividad enzimática de 487.8 U. Dicha especie fue empleada por Sánchez (2019) y Sánchez-Mata (2020), demostrado un alto potencial en la remediación de suelos contaminados por aceite lubricante usado, presentado degradación del contaminante de 94.26% y 99.90%, respectivamente. Lo anterior presenta una oportunidad para *Leonotis nepetifolia*, ya que se puede deducir que el sistema puede ser utilizado para la biorremediación de suelos con aceite lubricante usado bajo un tratamiento ex situ.

Conclusiones. Se estimó una actividad máxima de 226.8±18.9 U en las condiciones con pH de 8 a 37°C para la lipasa extraída de *Leonotis nepetifolia*, sin embargo, los valores presentados en el pH óptimo pueden elevarse al realizar pruebas con variación de temperatura.

Bibliografía.

- Avelar, M., Cassimiro, J., Santos, C., Domingues, C., De Castro, H. F., y Mendes, A. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products*, 44, 452–458.
- Chin, C., Shafiq, N., Nuruddin, F. (2012). Effects of used engine oil in reinforced concrete beams: the structural behavior. *International Journal of Civil and Geological Engineering*, 6(1), 83-90.
- Kumar, L., Bharadvaja, N. (2019). Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants. *Bioremediation Technologies: Microbial Enzymes*, 99.
- Marrero, D., Luisa, C., y Rico, M. (2015). Ácidos grasos constituyentes del aceite de las semillas de *Leonotis nepetifolia*. *Revista CENIC*, 46, 34–37.
- Pérez, R., Almécija M.C. (2011). Bi-Objective Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Porcine Blood Protein, *Biochem Eng J*, 53(3), 305-10.
- Sánchez, A. (2019). Evaluación de la lipasa de *Ricinus Communis L.* como agente potencial de remediación de suelos contaminados con aceite lubricante usado: Instituto Politécnico Nacional. México.
- Sánchez-Mata O. (2020). Evaluación de la bioestimulación con lombricomposta y lipasas de *Ricinus Communis L* en la remediación de suelos contaminados por aceite residual automotriz: Instituto Politécnico Nacional. México.
- Santos, C., Cassimiro, J., Avelar, M., Hirata, B., de Castro, F., Fernández, R., y Mendes, A. (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, 462–470.
- Tavares, F., Petry, J., Sackser, P. R., Borba, C. E., & Silva, E. A. (2018). Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. *Industrial Crops and Products*, 124, 254-264.