

# Aplicación de la pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) en el diseño de nuevos biocatalizadores

Pyto. CONACyT 14-INV-217  
Dpto. de Fisicoquímica



PROCIENCIA-CONACyT 14-INV-217



- El coco es el fruto del mbocayá
- Siglo anterior en el Paraguay con el propósito de obtener aceites que pueden extraerse de la pulpa y almendra, entre otros usos.
- La extracción del aceite de la pulpa es un proceso que se realiza por prensado quedando restos que finalmente se desechan.



# Objetivo del proyecto CONACyT 14-INV-217

La aplicabilidad de la pulpa de coco en el diseño de nuevos biocatalizadores a escala de laboratorio

\* uso de la pulpa de coco como biocatalizador por sí mismo

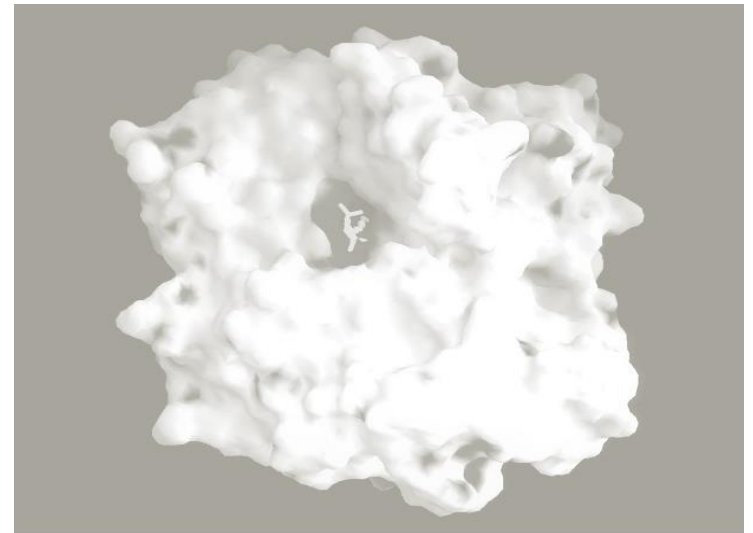
\* diseño de inmobilizados de lipasa (LPP) utilizando a la pulpa de coco como matriz de inmobilización



«En la naturaleza hay enzima donde hay sustrato» !!!!

- *Un deshecho de las industrias*
- *El aceite producido se hidroliza fácilmente aumentando su acidez*
- *Gran contenido de esteres de ácidos grasos de cadena media a larga (laurico o palmítico)*
- *Estudios preliminares por FTIR, grupos N-H, C=N*

## BIOCATALIZADORES



# Etapas de los experimentos

## **Eta**pa 1: **Caracterización taxonómica de la especie de coco y descripción de los aspectos microscópicos de la pulpa en función al tiempo de colecta**

- a) Colecta de cocos en tres tiempos
- b) Procesamiento de los frutos
- c) Obtención de la pulpa
- d) Descripción histológica de la pulpa

## **Eta**pa 2: **Caracterización fisicoquímica de la especie de pulpa de coco en función al tiempo de colecta.**

- a) Espectroscopia Infra Roja para la determinación de grupos funcionales
- b) Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica para evaluación de propiedad paramagnética
- c) Análisis Elemental de la pulpa y pulpa derivatizada
- d) Obtención de soportes ferromagnéticos de pulpa de coco por coprecipitación
- e) Microscopia de Barrido Electrónico para evaluar la superficie

## **Eta**pa 3: **Evaluación de la actividad lipasa de la pulpa de coco**

Determinación de la actividad lipasa por los métodos colorimétrico DTNB y de Tizo y col. (convencional y no convencional de biocatalisis)

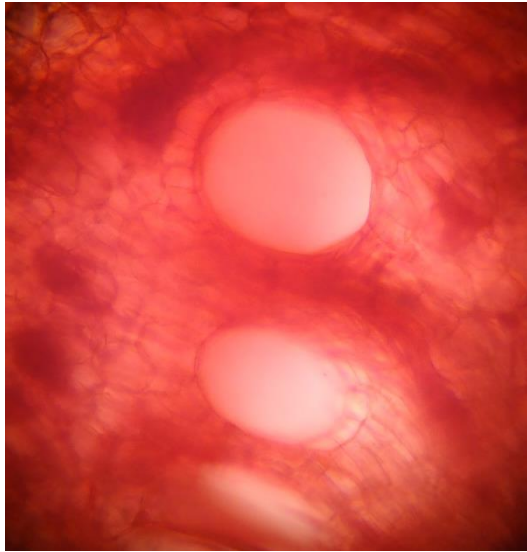
## **Eta**pa 4: **Evaluación de la actividad y rendimiento de inmovilización de derivados enzimáticos de lipasa inmovilizados sobre matriz de pulpa de coco**

# Etapa I: Caracterización taxonómica de la especie de coco y descripción de los aspectos microscópicos de la pulpa en función al tiempo de colecta

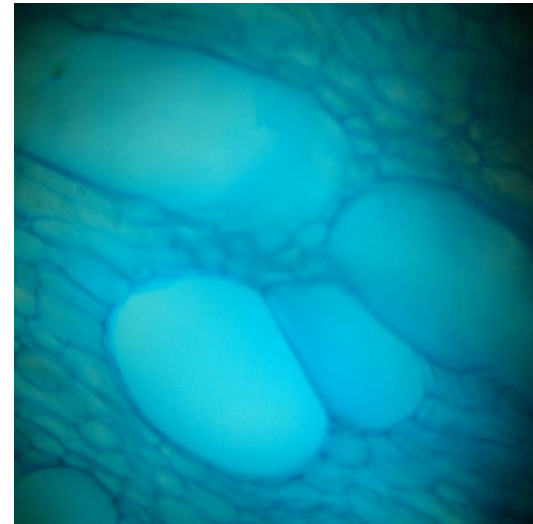
		Primera colecta	Segunda colecta	Tercera colecta
Frutos	Estado de maduración	Maduros	Inmaduros	Inmaduros
	Diámetro	3,48 cm (DSR=2,30%)	3,50 cm (DSR=2,87%)	3,07 cm (DSR=1,43%)
Epicarpo del fruto	Descripción	Verde-amarronado, liso y lustroso, coriáceo, de fácil desprendimiento	Verdoso, liso, cubierto por una fina capa de cera, coriáceo, de difícil desprendimiento	Verdoso, liso, cubierto por una capa de cera, coriáceo, de difícil desprendimiento
	Espesor	0,5 mm	0,5 mm	1,0 mm
Mesocarpo del fruto	Descripción	Amarillo-anaranjado, untuoso al tacto (Fig. 4)	Amarillo pálido, compacto, untuoso al tacto y algo más duro que el de la primera colecta (Fig. 5)	Blanquecino, compacto, duro y untuoso al tacto
	Espesor	5-6 mm	4-5 mm	4-5 mm

- Bosque nativo
- Colectas desde finales de noviembre 2015 a junio 2016
- Material colectado y georeferenciado
- Características morfológicas y microscópicas

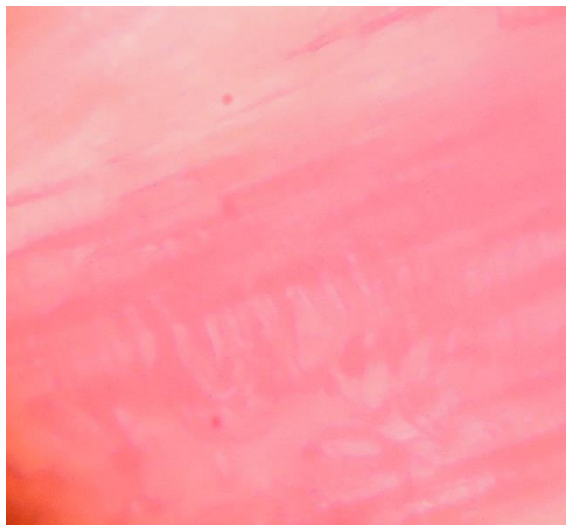




CT. Pulpa de coco. **1ra. colecta**



CL. Pulpa de coco. **2da. colecta**



CL. Pulpa de coco. **3ra. colecta**

**Medidas de la Actividad Lipasa de pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*)  
correspondiente a la primera, segunda y tercera colecta de frutos**

<b>COLECTA</b>	<b>ACTIVIDAD LIPASA unidad : U/L</b>	<b>PROMEDIO de Actividades en U/L</b>
<b>PRIMERA: 13/11/15</b>	1,143	0,809± 0,298
	0,571	
	0,714	
<b>SEGUNDA: 26/02/16</b>	0,857	1,238± 0,436
	1,714	
	1,143	
<b>TERCERA: 24/06/16</b>	2,428	1,571± 0,857
	0,714	
	1,571	





**Tabla 1.** Resultados de los ensayos fisicoquímicos aplicados a la pulpa de coco obtenida por el método convencional (A) y con pre-secado de los frutos (B). ANOVA ( $p \leq 0.05$ )

Determinaciones fisicoquímicas en base seca	A	B
Humedad (%)	41.25±0.5	7,81±0.5
Materia grasa (%)	37.5±0.5	25,2 ±0.5
Acidez del aceite Extraído	16,13±0.5	8.14±0.5
Cenizas	3,95±0.5	3,69±0.5
Cenizas insoluble	0,02±0.5	0,05±0.5
Carbohidratos (mg/100mgM)	31.58±0.5	36.06±0.5
Fosforo	0.13±0.5	0.13±0.5
Fibra bruta (%)	5.91±0.5	6.95±0.5
Proteína cruda (%)	4,86±0.5	5.48±0.5
Capacidad calorífica cal/g	5958,32±4	5262,01735±4

- *Tesis Lic. Victoria Valdovinos, Marzo 2016*
- *Propiedades fisicoquímicas y de procesamiento de la pulpa de coco (Acrocomia aculeata) para su aplicación como ingrediente en un producto alimenticio. Revista Investigación Agraria, FCA-UNA, Paraguay*

Control Union, Py

## Etapa 2: Caracterización fisicoquímica de la especie de pulpa de coco en función al tiempo de colecta



Muestra congelada

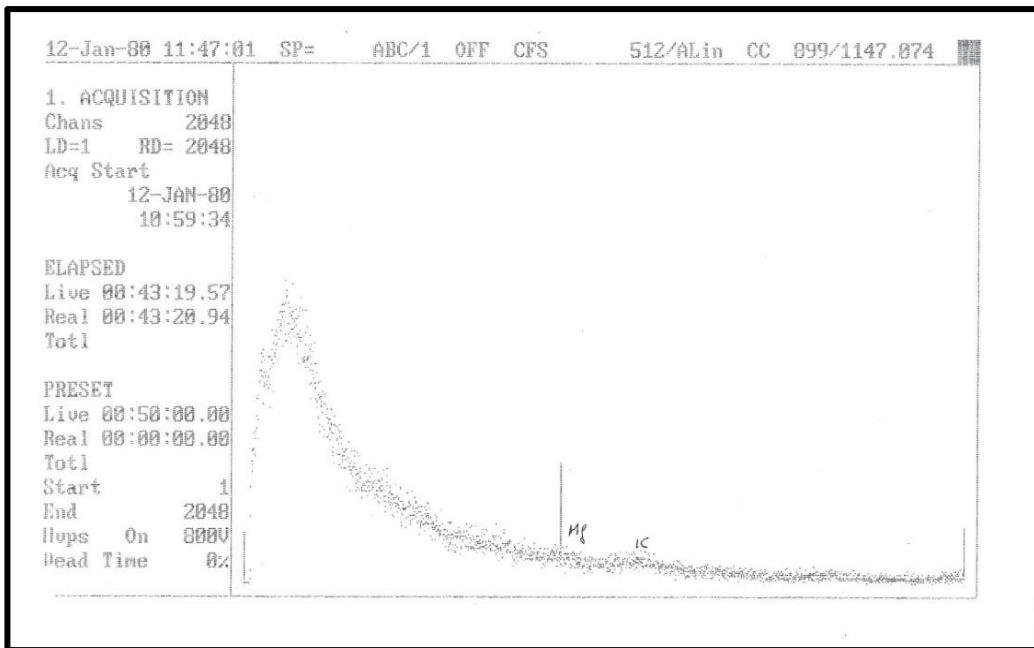
Actividad de  
enzima en  
medio  
convencional

Muestra seca

Molienda

Biocatalizadores

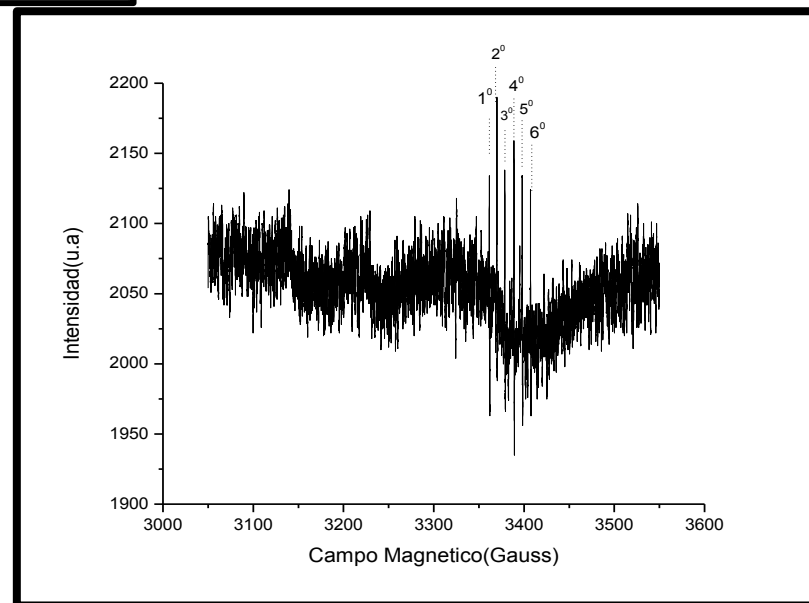
Actividad de  
enzima (lipasa) en  
medio no  
convencional

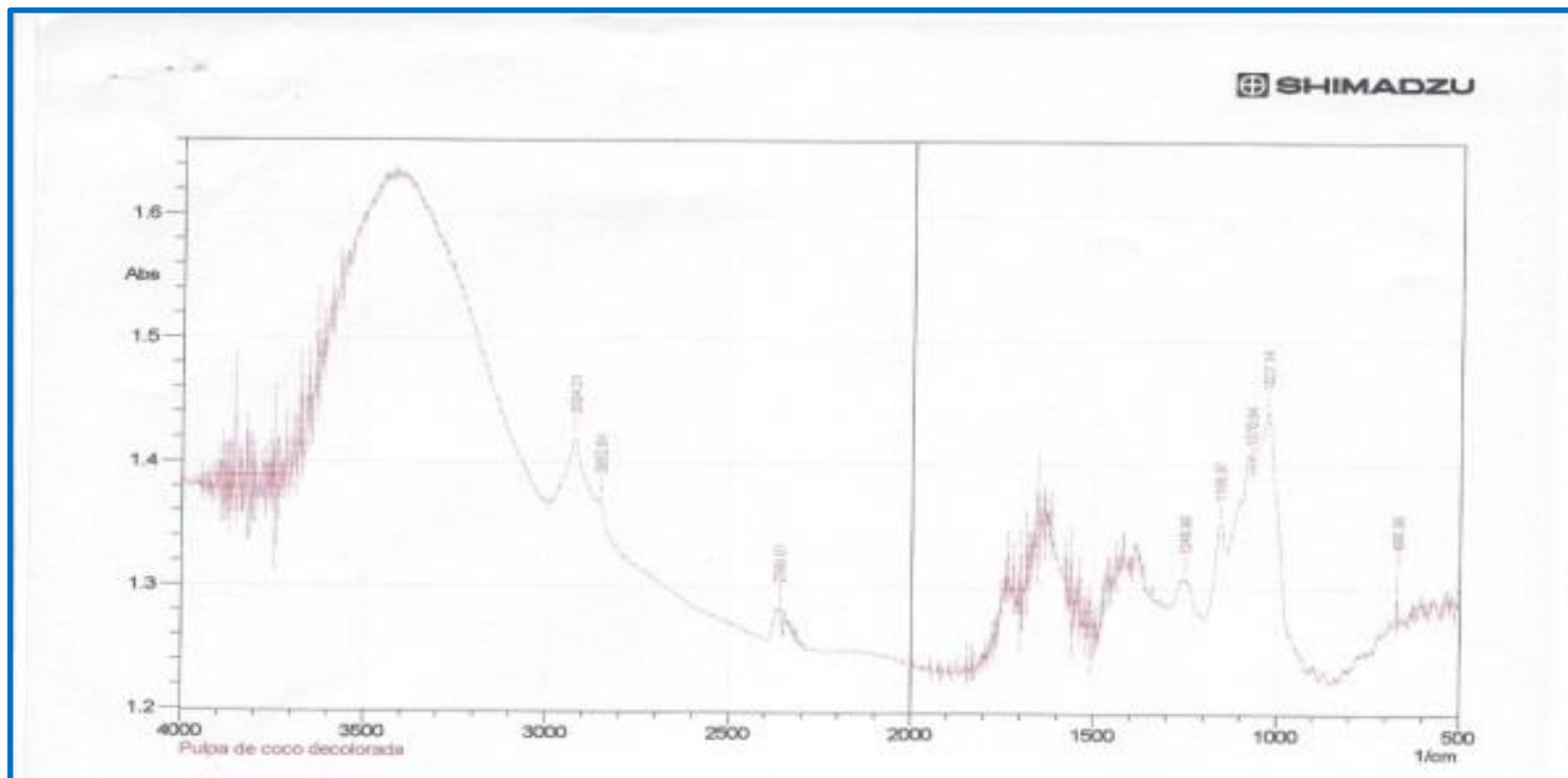


## Activación Neutrónica

## ESPR

Estudios  
 Preliminares



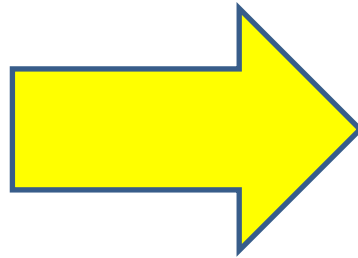


## FTIR

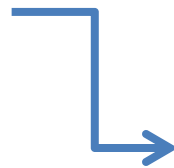
*Dobles enlaces C=N/N=O a 1600 cm<sup>-1</sup> y picos de 2400 cm<sup>-1</sup> y 3600 cm<sup>-1</sup> que indican la presencia de alargamientos de enlaces (+ NH) y uniones NH no asociados que serian sitios ideales para el anclaje de proteínas o metales*

## Etapa 3: Evaluación de la actividad lipasa de la pulpa de coco

Formas de  
Biocatalizador



- Fibra de pulpa tratada
- Fibra de pulpa + LPP
- Fibra de pulpa tratada con glutaraldehído + LPP
- Fibra de pulpa magnetizada



Sistemas no convencionales  
de biocatálisis

Transesterificación enzimática a  
través de lipasas

## Números de onda de espectros IR de las fibras de coco y de los derivados de LPP inmovilizados

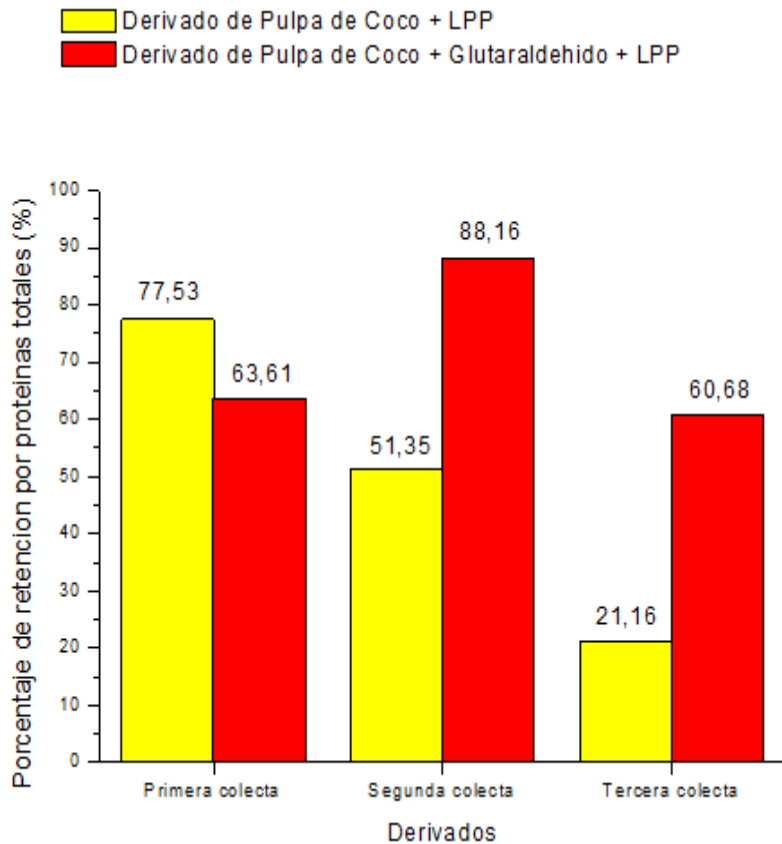
	3500	2920	1730	1030 y 1060
<b>Formas de biocatalizador</b> 	Alargamientos de N-H no asociados	Estiramiento C-H alargamientos N-H+	Estiramientos C=O, C-C(=O)-O	Tensiones C-O-C C=N
<b>Fibra nativa</b>		X		X
<b>Biocat 1: Fibra tratada</b>	X	X		X
<b>Biocat 2: LPP sobre fibra decolorada</b>	X	X	X	X
<b>Biocat 3: LPP sobre fibra decolorada activada con glutaraldehido</b>	X	X		X

# Pruebas de solubilidad de la fibra de COCO

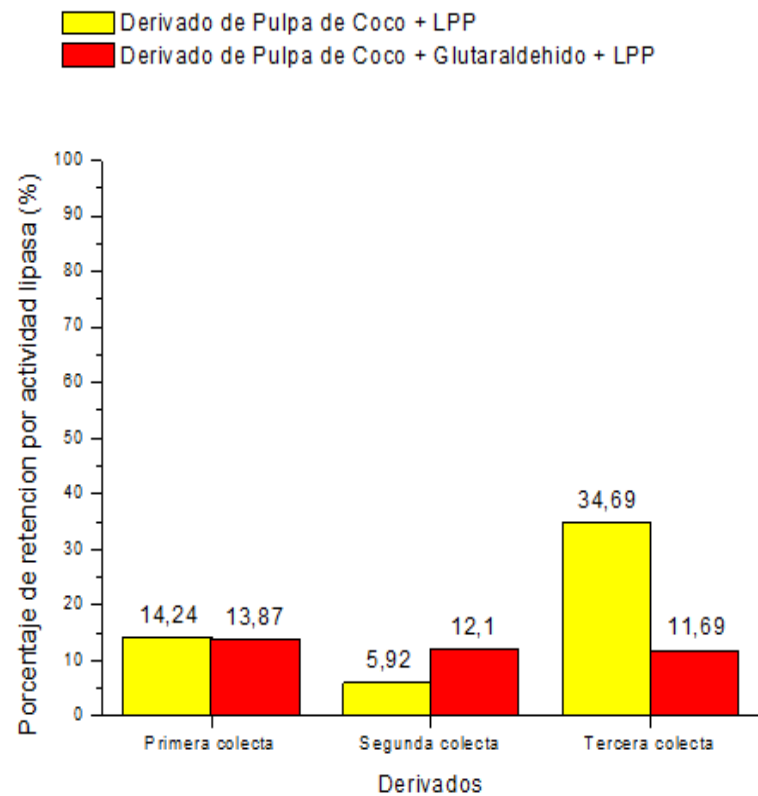
Tabla 3: Solubilidad de la pulpa de coco *Acrocomia aculeata* en distintos solventes

Solvente	Solubilidad en sistema nativo	Solubilidad fibra de coco decolorada	Solubilidad de fibra de coco derivatizada con glutaraldehído
Hexano	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Isobutanol	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Terbutanol	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Etanol	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Agua	Poco soluble	Insoluble	Insoluble





**Fig 1. Porcentaje de retención de LPP sobre matrices de pulpa de coco calculadas a partir de la concentración de proteínas totales**



**Fig.2 Porcentaje de retención de actividad enzimática de LPP sobre matrices de pulpa de coco calculadas a partir de la actividad lipasa**



## Retention rate of pancreatic lipase enzyme immobilized on three types of supports

### Pancreatic lipase immobilized on bleached coconut pulp

Retained Protein concentration	77,53%
--------------------------------	--------

Retained lipase activity	14,24%
--------------------------	--------

### Pancreatic lipase immobilized on bleached coconut pulp with glutaraldehyde

Retained Protein concentration	63,61%
--------------------------------	--------

Retained lipase activity	13,87%
--------------------------	--------

### Pancreatic lipase immobilized on magnetized coconut pulp

Retained Protein concentration	80%
--------------------------------	-----

Retained lipase activity	14%
--------------------------	-----

1ra.colecta

CBCIMaT, 2016

**Comparación de los ácidos grasos formados expresados como Eq/L de H<sup>+</sup> generados en la reacción de hidrolisis de una emulsión 0,5% (O/W) Tween 80 en medio heterogéneo a 25°C**

Biocatalizador	Eq/L de H <sup>+</sup>
Matriz de pulpa de coco	0,0030
Inmovilizado de lipasa pancreática s/matriz de pulpa de coco	0,0042
Lipasa inmovilizada comercial de <i>C. antártica</i>	0,00301
CAL-B	
Lipasa inmovilizada de <i>R.mihei</i>	0,00511

**23 Congreso Iberoamericano de Catálisis. (CICAT)  
Montevideo. Uruguay. 2016**

**Enzima  
inmovilizada**

Enzima confinada o localizada en una cierta región definida del espacio con retención de su actividad catalítica, la cual puede ser usada en forma continua y repetida

**Enzima soluble  
(catalizador  
homogéneo)**

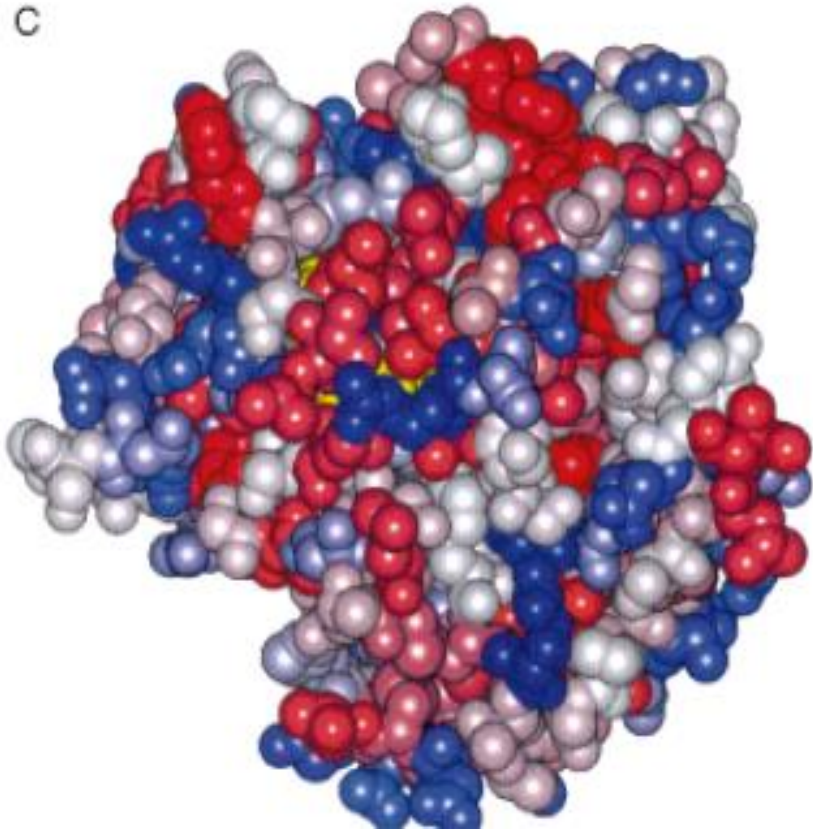


**Enzima insoluble  
(catalizador  
heterogéneo)**

**Esto permite:**

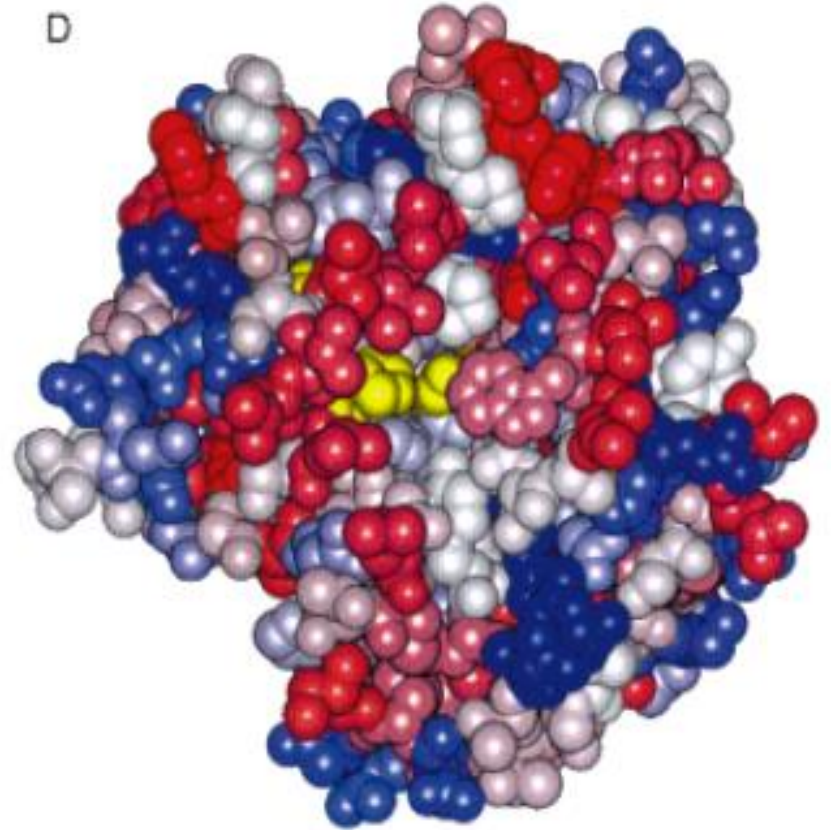
- reuso
- desarrollo de sistemas continuos
- efluentes libres de biocatalizador
- mayor estabilidad

C



***Cerrada***

D



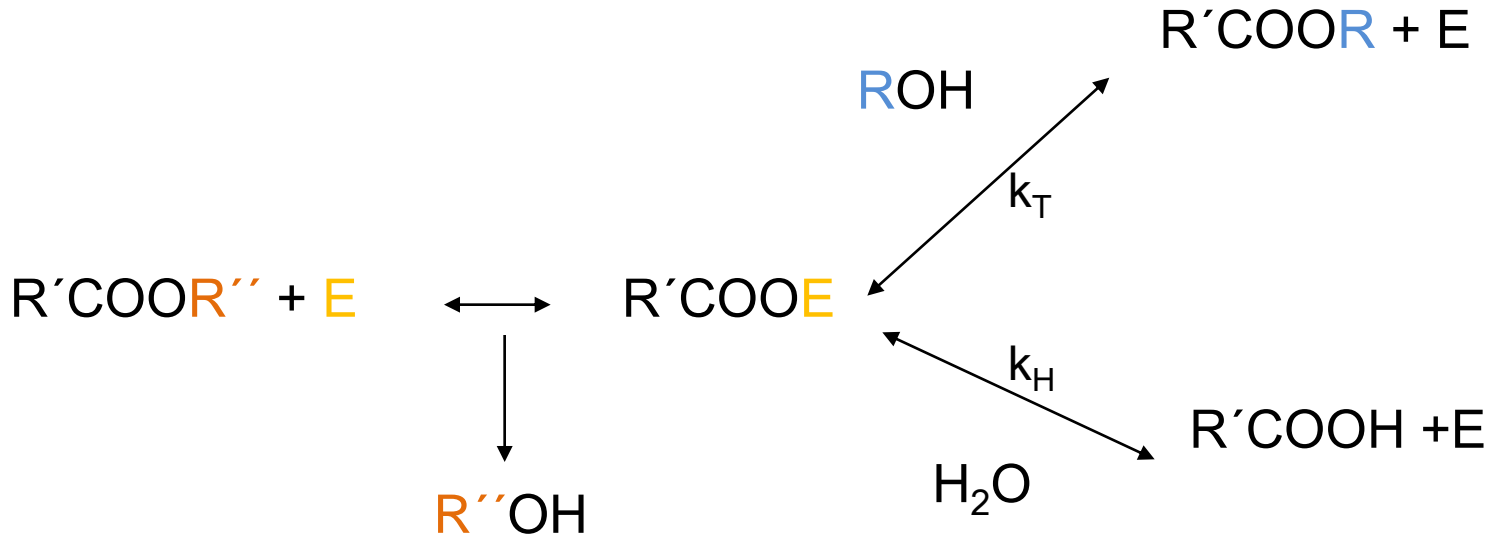
***Abierta***

➤ En rojo zonas polares y en azul zonas hidrofóbicas

➤ En amarillo sitio activo

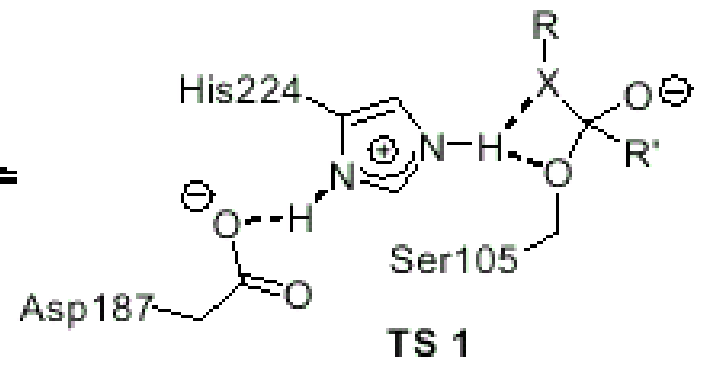
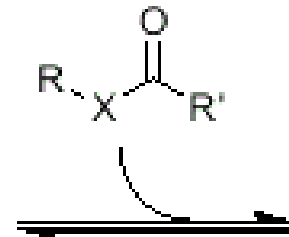
## Producción de un éster con la lipasa actuando como transferasa:

El intermediario acil-enzima puede ser desacilado por otro nucleófilo, como un alcohol, un ácido u otro éster.

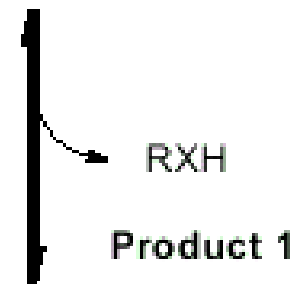


En medio no acuoso se forma un **alcohol** a partir del éster primario y un **éster** del nucleófilo

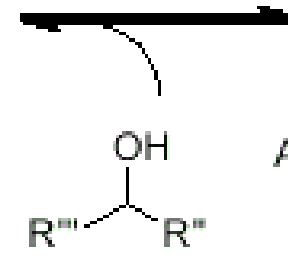
**Substrate 1**



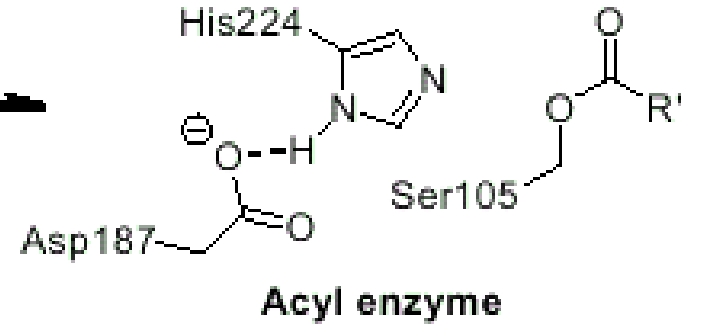
**TS 1**



**Product 1**

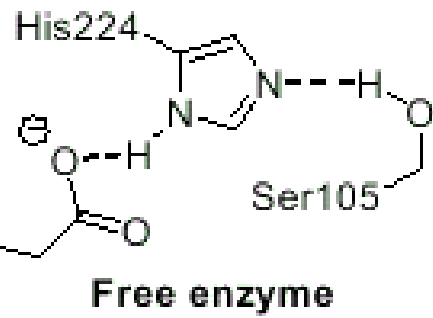


**Substrate 2**

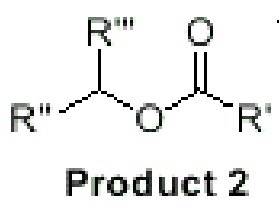


**TS 2**

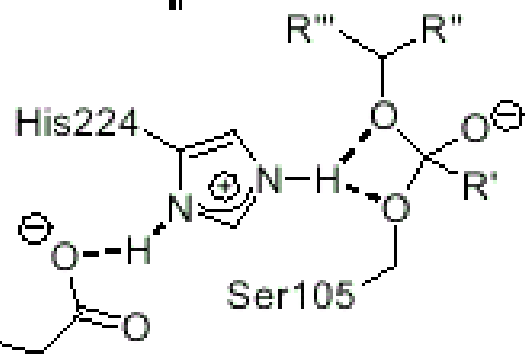
**Acyl enzyme**



**Free enzyme**



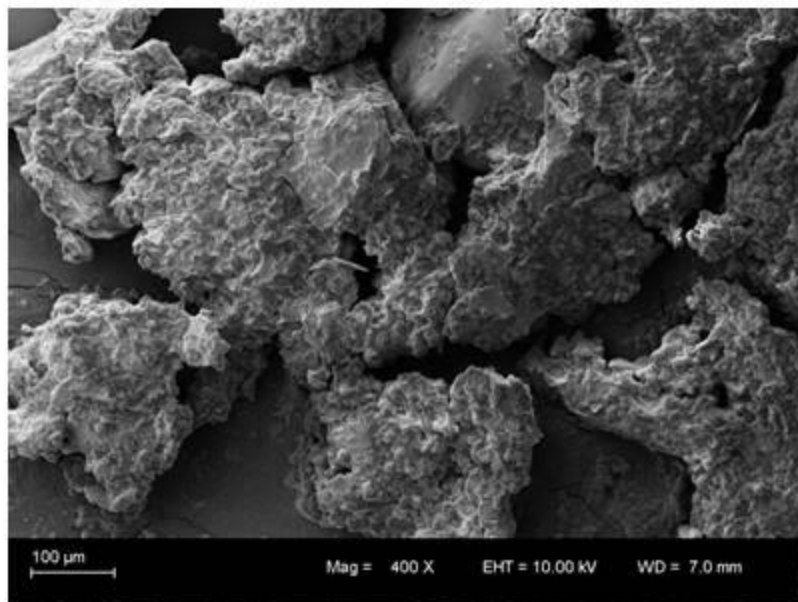
**Product 2**



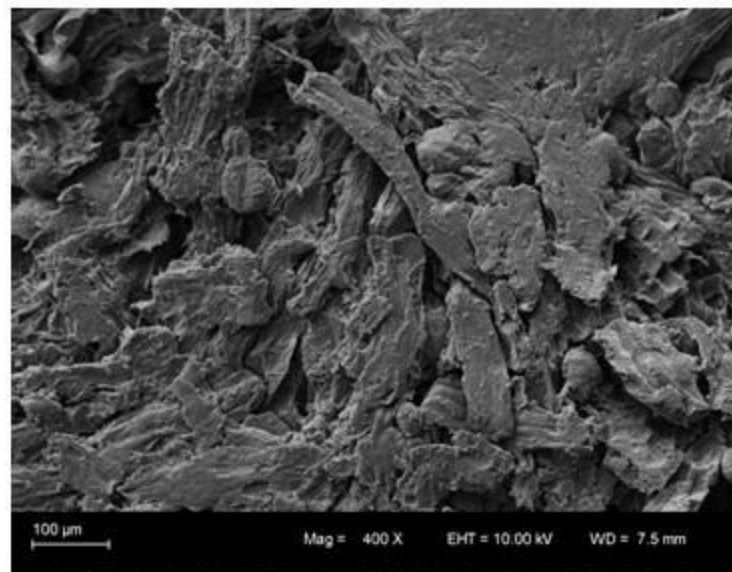
**TS 2**

**Acyl enzyme**

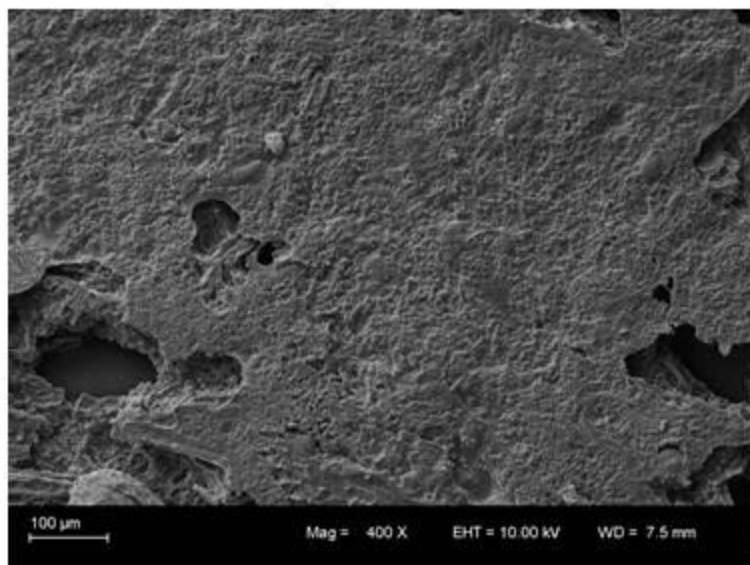
Fibra



Fibra + Lipasa

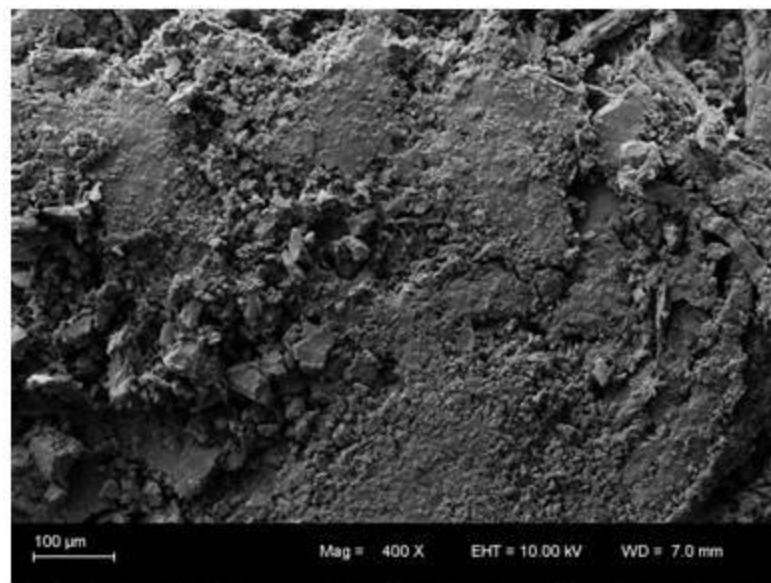


Fibra + Glu + Lipasa

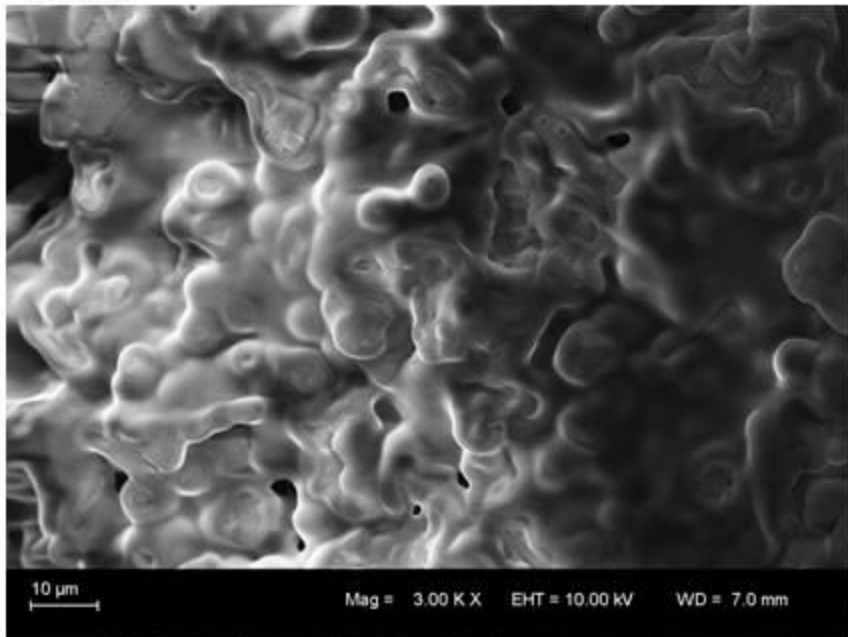


PROCIENCIA-CONACYT 14-INV-217

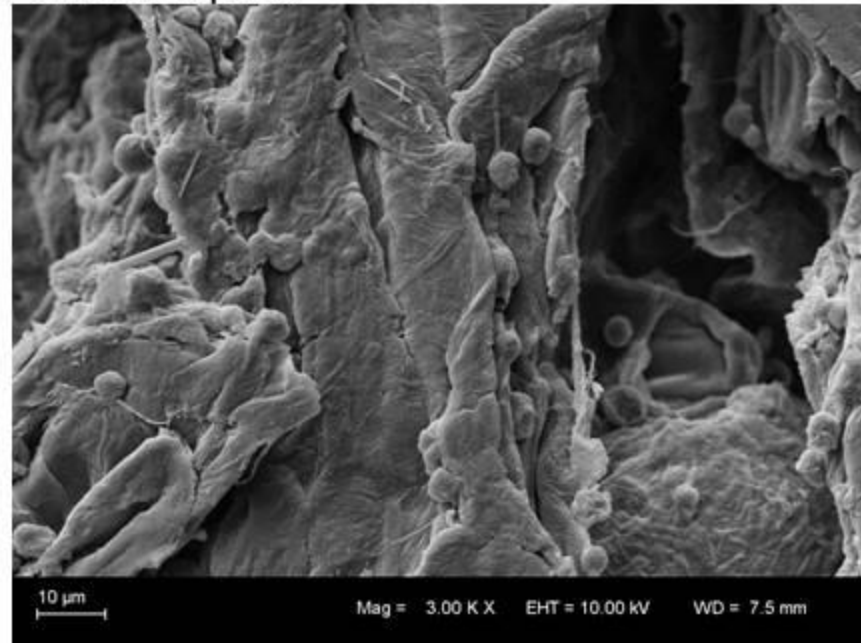
Fibra + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + Lipasa



Fibra

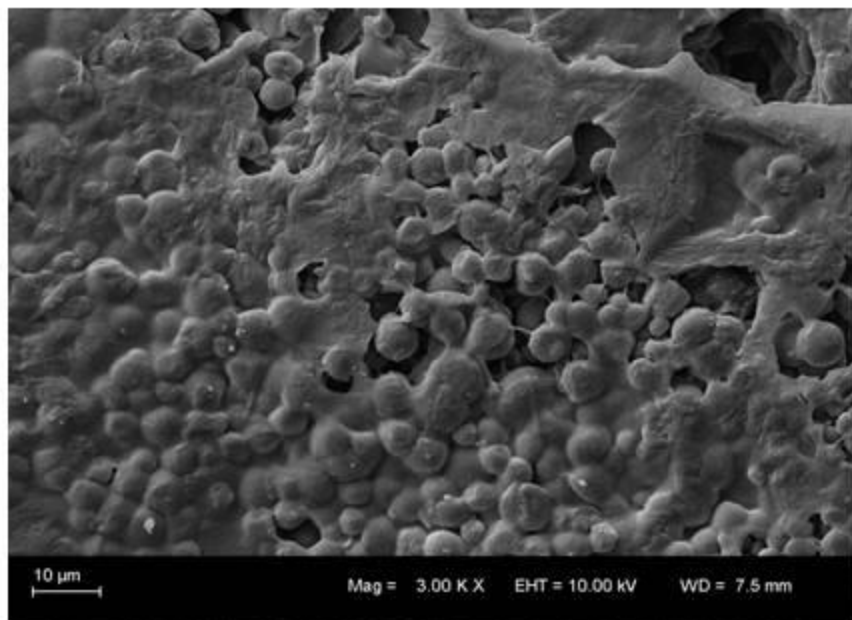


Fibra + Lipasa

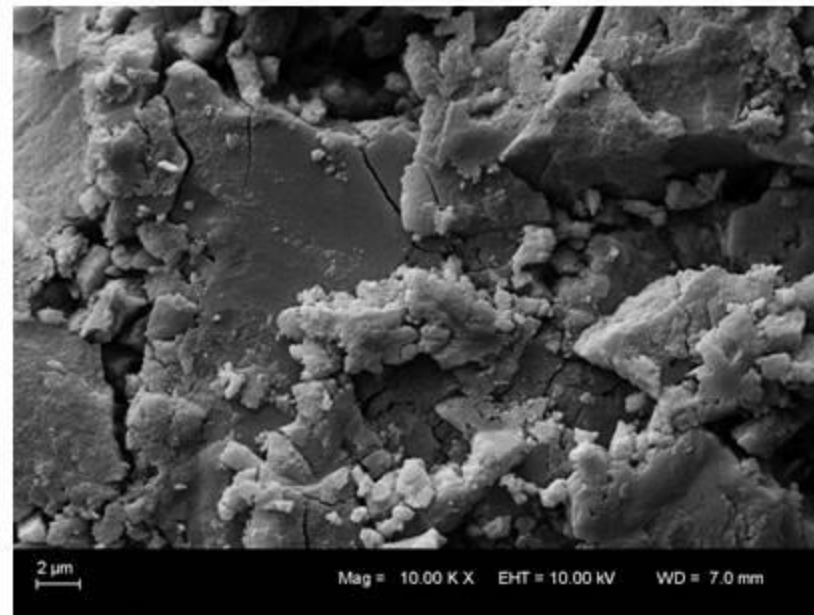


Fibra + Glu + Lipasa

PROCIENCIA-CONACyT 14-INV-217

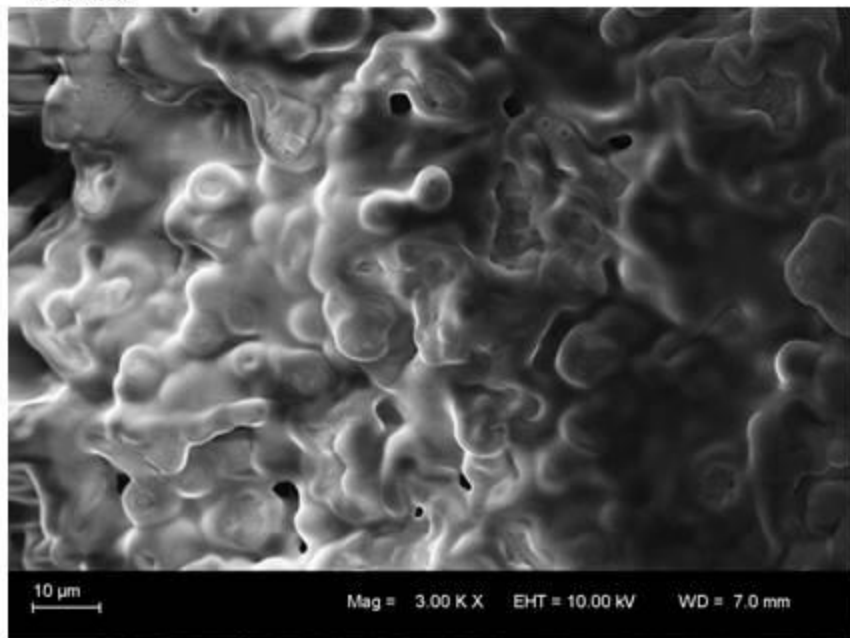


Fibra + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + Lipasa

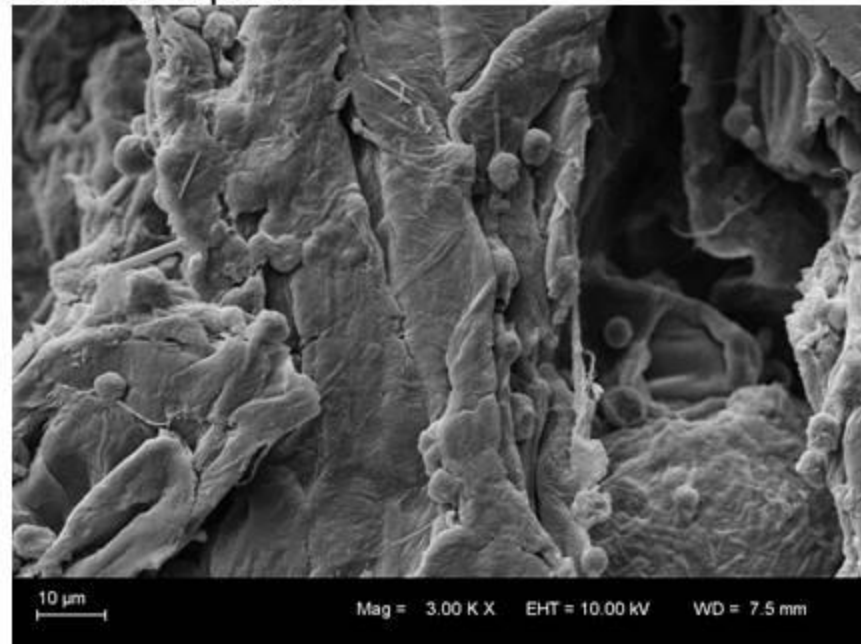




Fibra

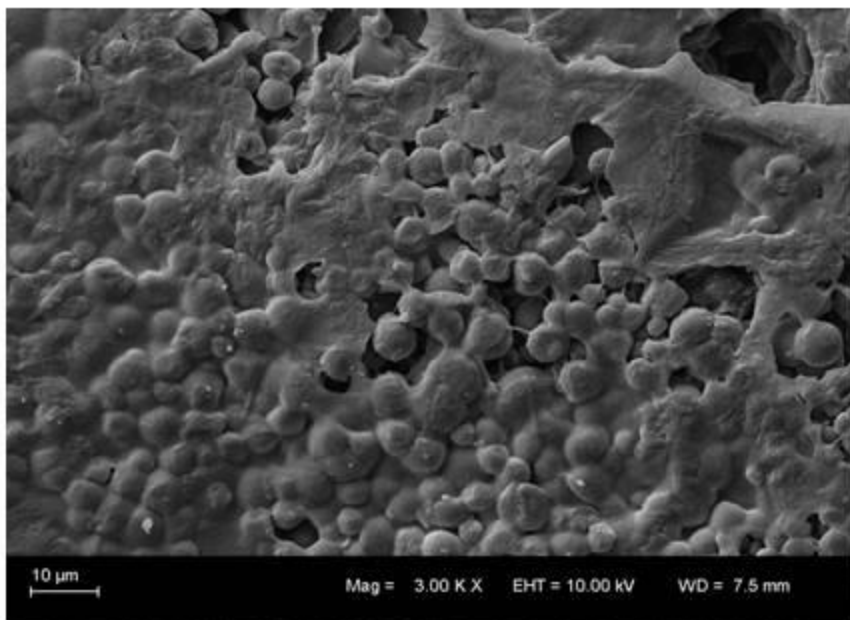


Fibra + Lipasa

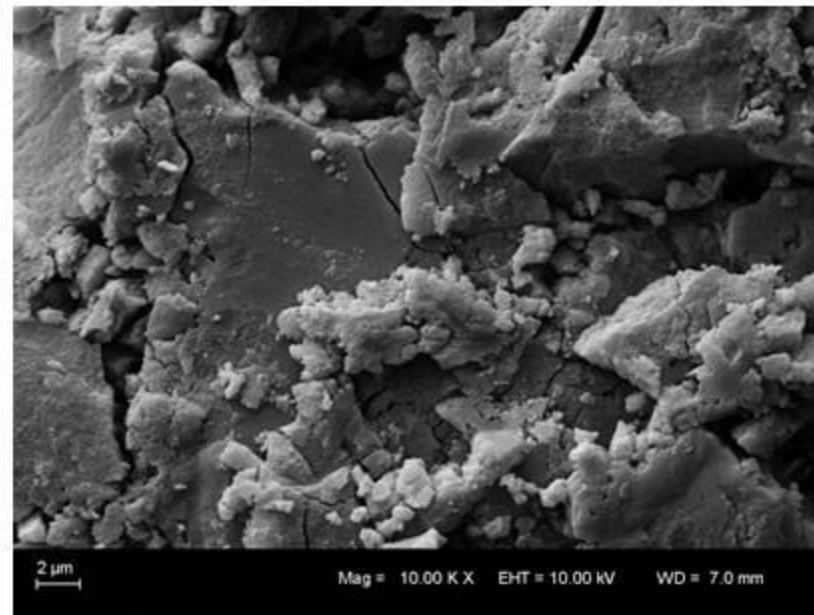


Fibra + Glu + Lipasa

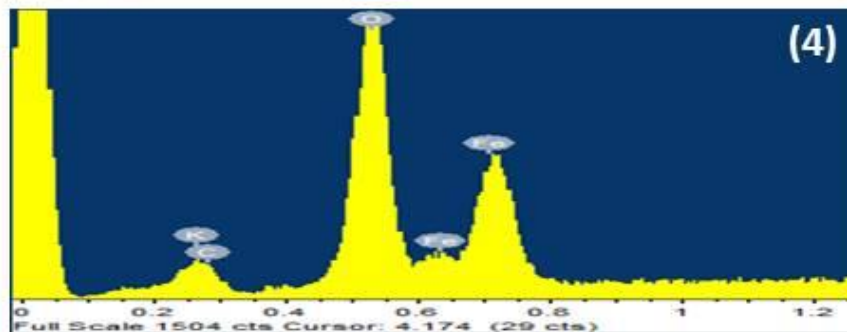
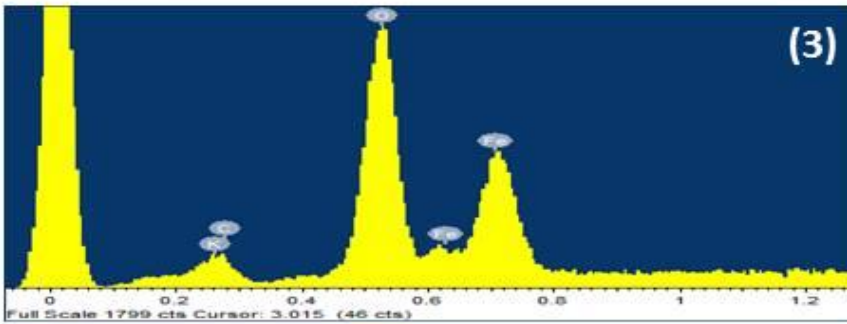
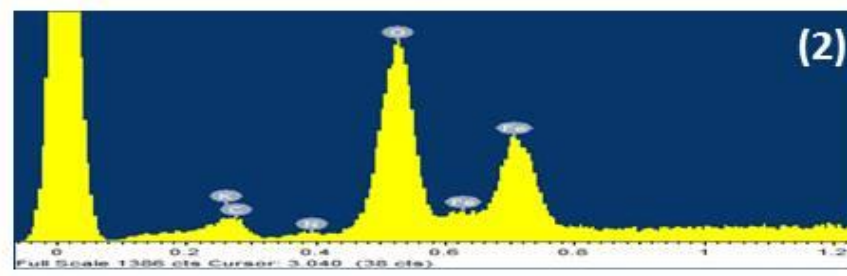
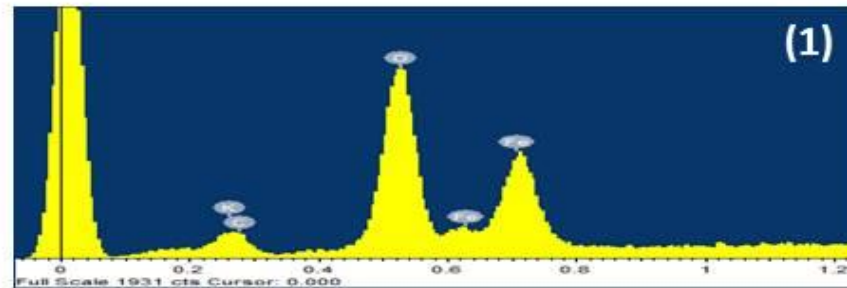
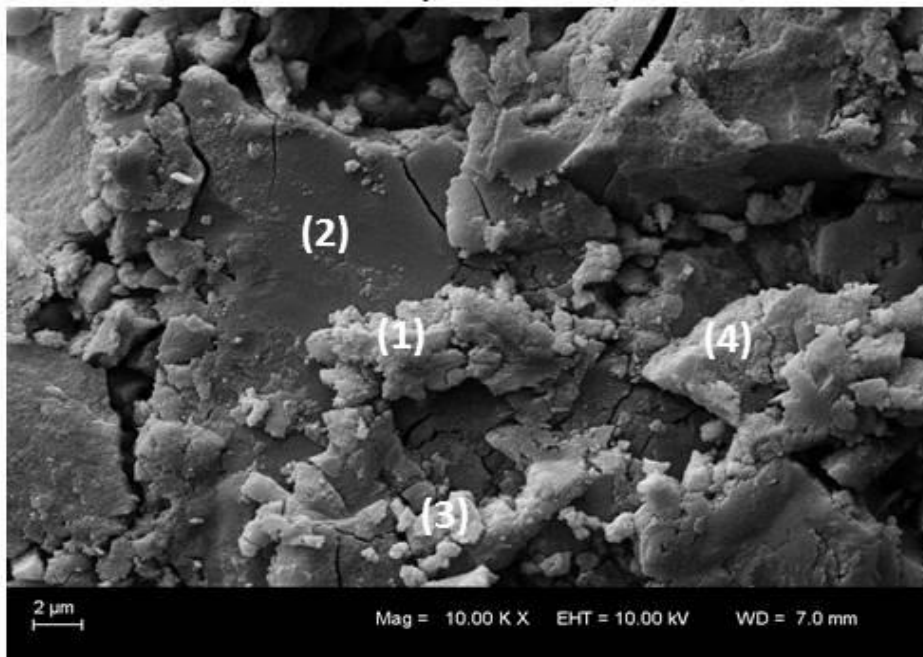
PROCIENCIA-CONACyT 14-INV-217



Fibra + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + Lipasa



# Fibra + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + Lipasa



## Composición Elemental semicuantitativo

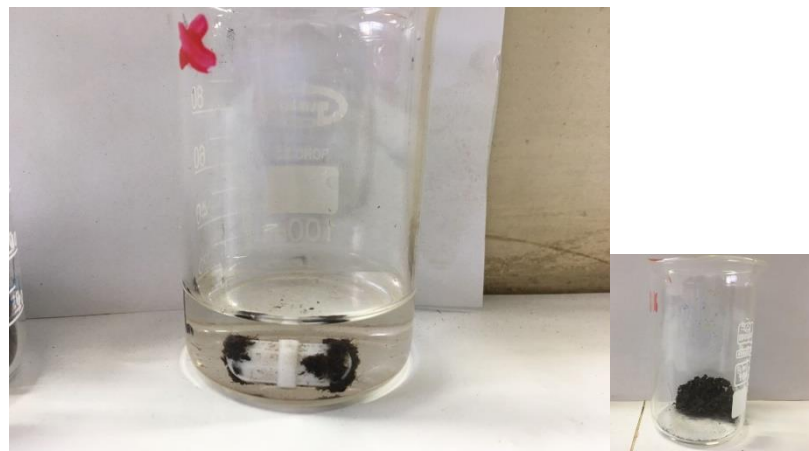
Espectro	%C	%N	%O	%K	%Fe
(1)	6.66	ND	28.44	1.66	63.24
(2)	5.18	1.87	28.72	2.18	62.04
(3)	5.71	ND	29.19	1.29	63.81
(4)	5.93	ND	29.36	1.44	63.28

# Reaction mechanism for obtaining the magnetic biocomposite with coconut pulp :

$$\text{Pulp} + \text{Fe}^{+2} + 2\text{Fe}^{+3} + 8\text{OH}^{-} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{OH})_2 + 2\text{Fe}(\text{OH})_3 \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O} + \text{Biocomposite}$$

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos fisicoquímicos aplicados a la pulpa de coco obtenida por el método convencional (A) y con pre-secado de los frutos (B). ANOVA ( $p \leq 0.05$ )

Determinaciones fisicoquímicas en base seca	A	B
Humedad (%)	41.25±0.5	7,81±0.5
Materia grasa (%)	37.5±0.5	25,2 ±0.5
Acidez del aceite Extraído	16,13±0.5	8.14±0.5
Cenizas	3,95±0.5	3,69±0.5
Cenizas insoluble	0,02±0.5	0,05±0.5
Carbohidratos (mg/100mgM)	31.58±0.5	36.06±0.5
Fosforo	0.13±0.5	0.13±0.5
Fibra bruta (%)	5.91±0.5	6.95±0.5
Proteína cruda (%)	4,86±0.5	5.48±0.5
Capacidad calorífica cal/g	5958,32±4	5262,01735±4

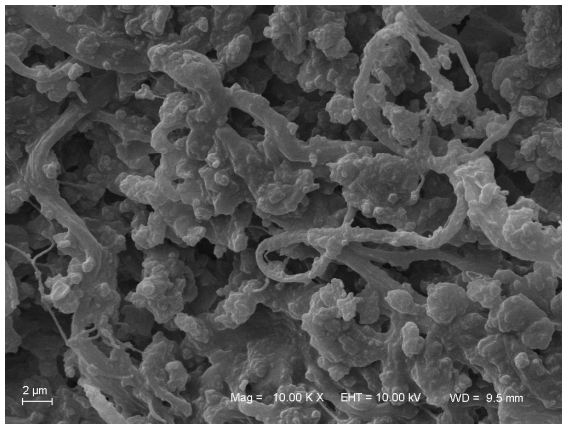


- ✓ *22 Congreso Brasileiro de Ingeniería en Ciencias de los Materiales (CBCIMat). Natal, Brasil. 2016*
- ✓ *23 Congreso Iberoamericano de Catálisis. (CICAT) Montevideo. Uruguay. 2016*
- ✓ *Propiedades fisicoquímicas y de procesamiento de la pulpa de coco (Acrocomia aculeata) para su aplicación como ingrediente en un producto alimenticio. Revista Investigacion Agraria, FCA-UNA, Paraguay*
- ✓ *Tesis de grado de Lic. Victoria Valdocinos (CTA) y Bioq. Juan Ayala (B)*
- ✓ *Trabajo de iniciación científica Bioq. Cynthia Bernal y Bioq. Juan Ayala*



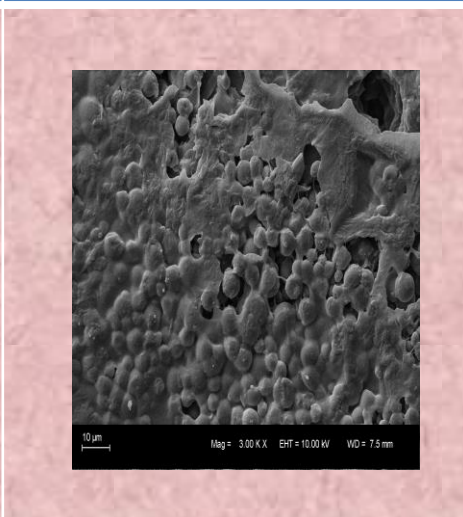
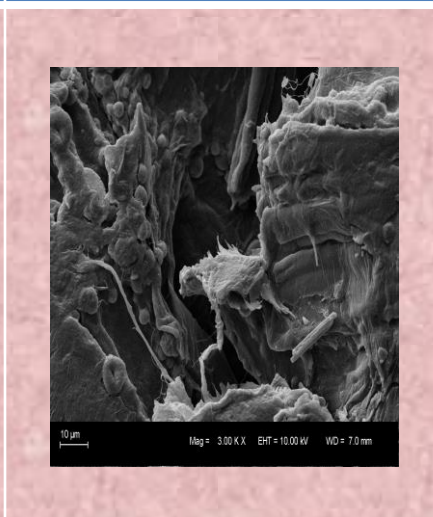
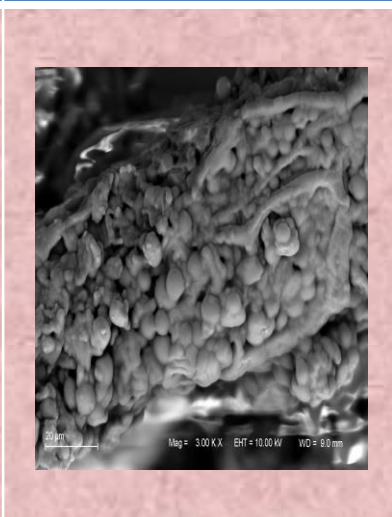
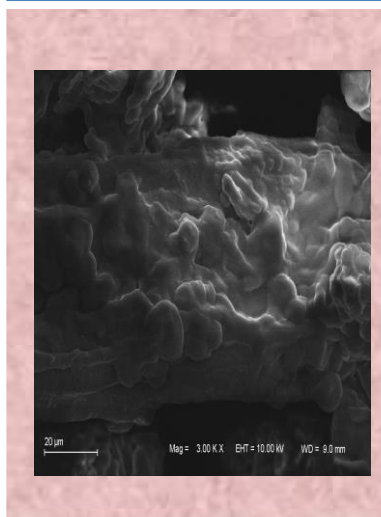
**Análisis químico elemental por espectroscopia (EDX) de la superficie de Lipasa pancreática porcina (LPP), fibra de pulpa de coco y derivado inmovilizado**

<b>%</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Cl</b>	<b>P</b>
<b>LPP</b>	56.12	20.50	21.85	0.45	1.09	-	-	-
<b>Fibra nativa</b>	81.96	2.79	14.43	-	0.58	0.09	0,15	-
<b>Fibra decolorada</b>	61.01	3.58	32.85	-	2.16	-	0,39	-
<b>LPP sobre fibra decolorada</b>	54,64	11,90	26,44	-	4,03	-	-	3,00



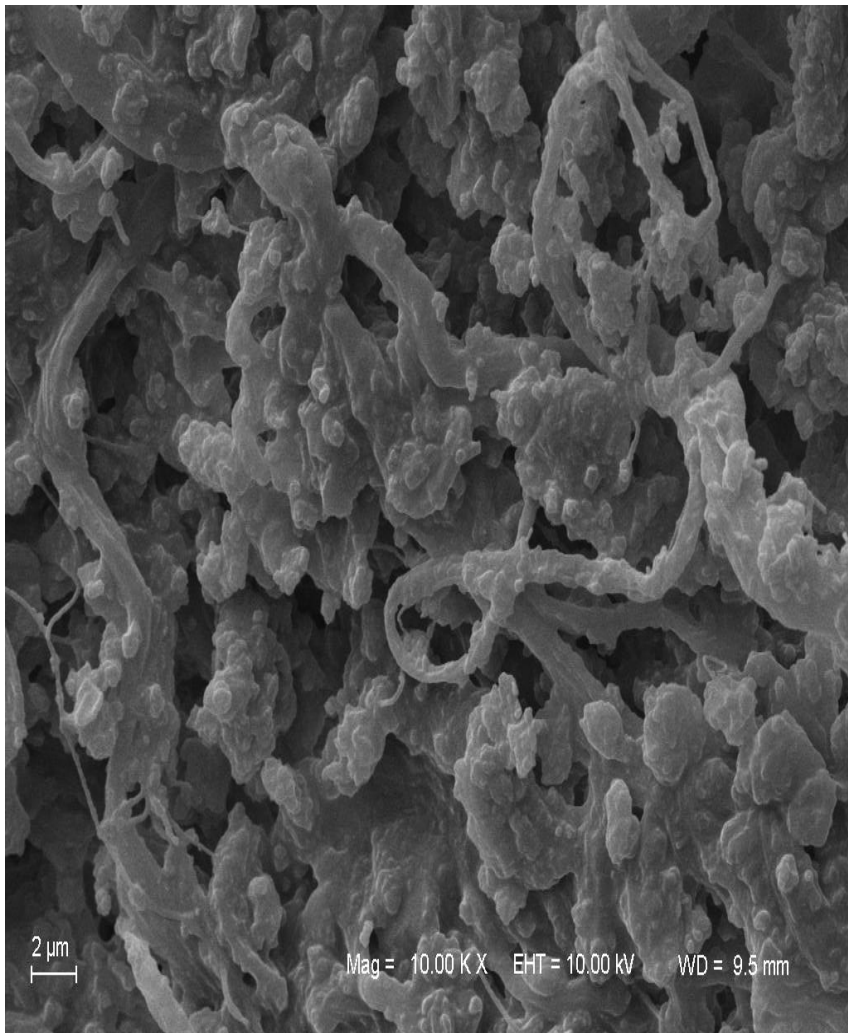
Lipasa pancreatica porcina

Fibra nativa	Fibra despigmentada	Inmovilizado de LPP s/ fibra decolorada	Inmovilizado de LPP s/fibra decolorada + glutaraldehido
--------------	---------------------	---	---

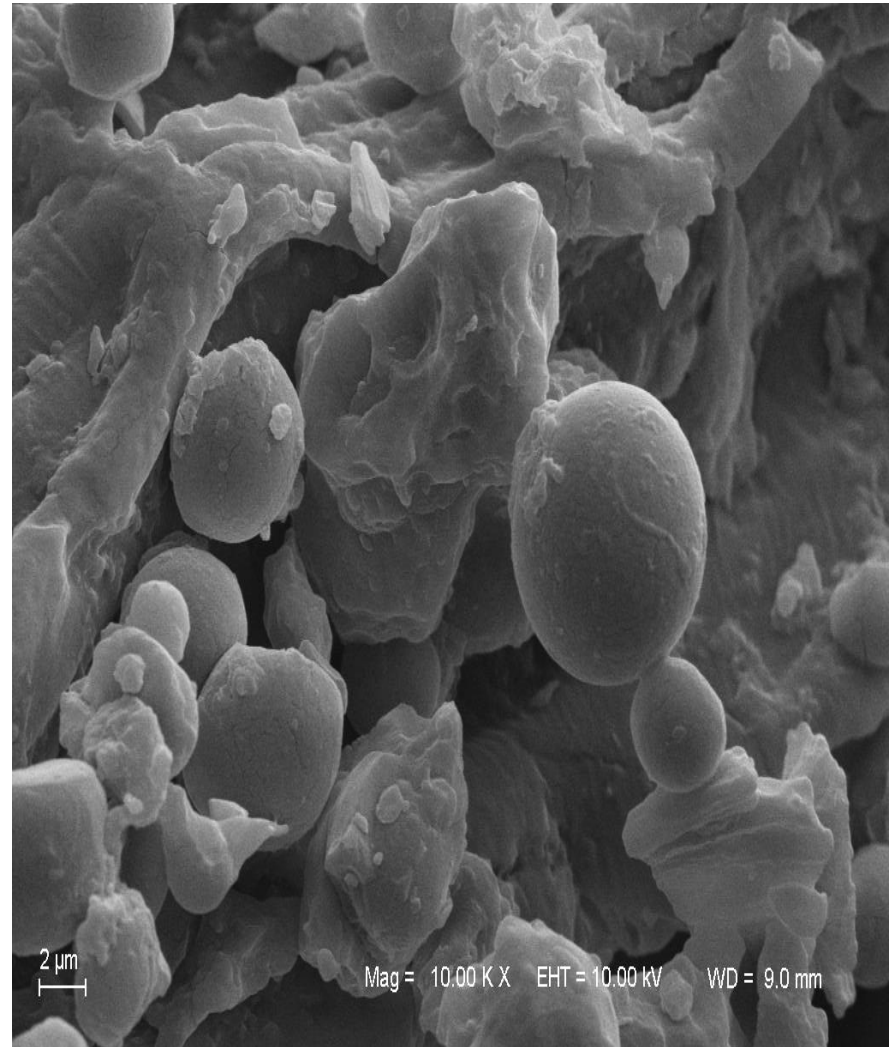




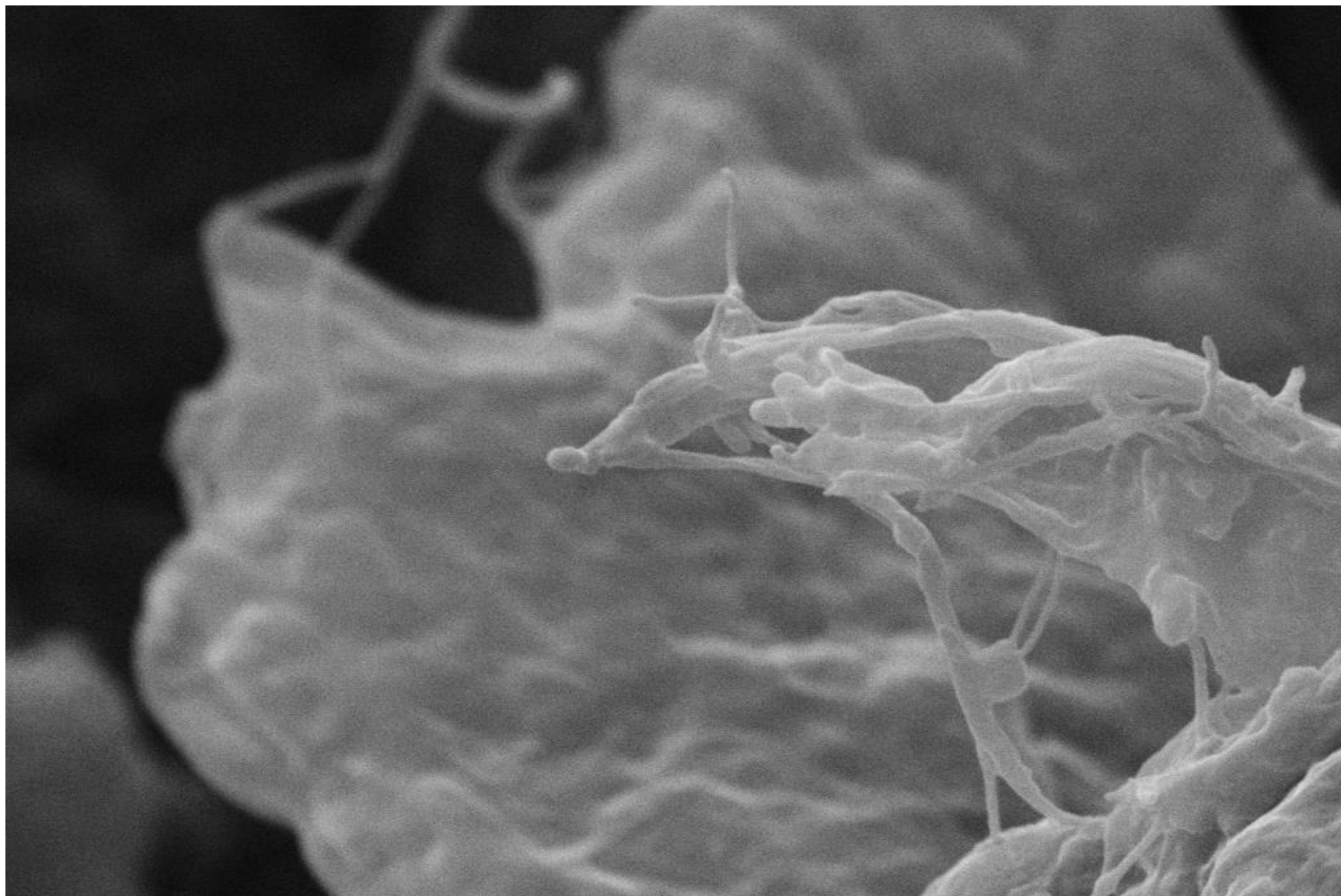
Microscopia de la pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*)



LPP



Pulpa

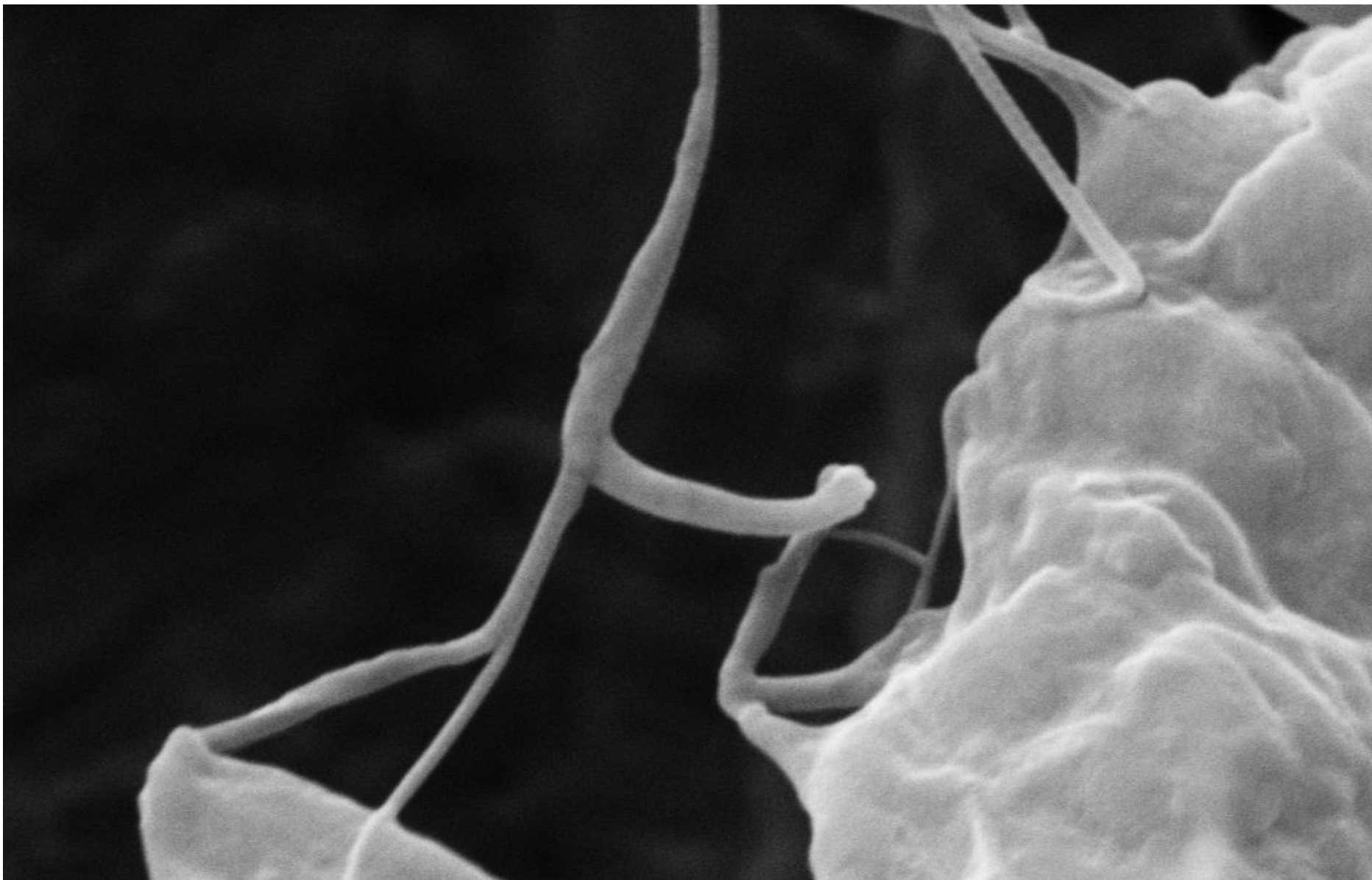


1  $\mu\text{m}$

Mag = 24.85 K X EHT = 10.00 kV

WD = 7.0 mm





1  $\mu\text{m}$

Mag = 50.00 K X    EHT = 10.00 kV    WD = 7.0 mm

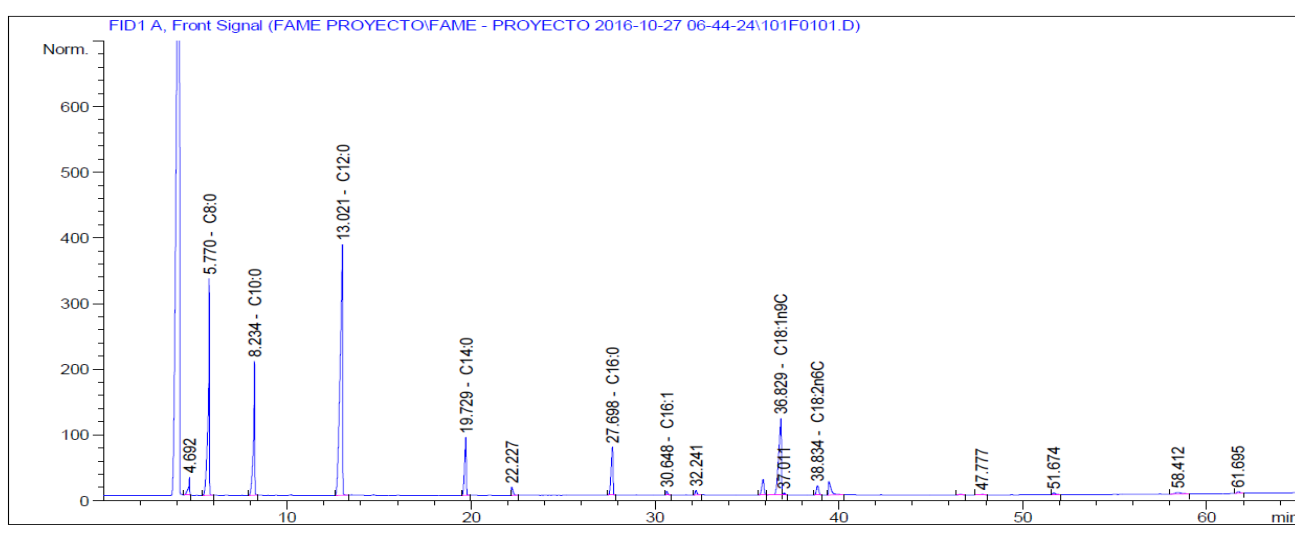


Gráfico del **1er. ciclo de conversión biocatalítica** para la forma C en presencia de aceite de coco + metanol a 38,5°C y 100 RPM para 14 horas de reacción

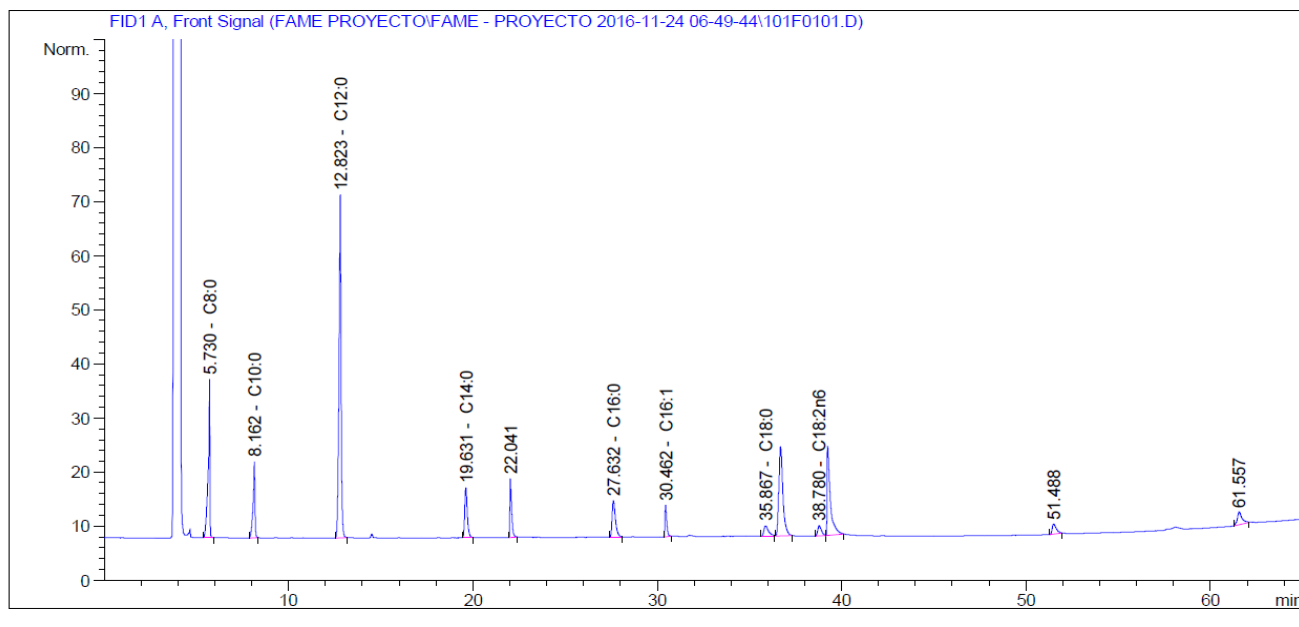
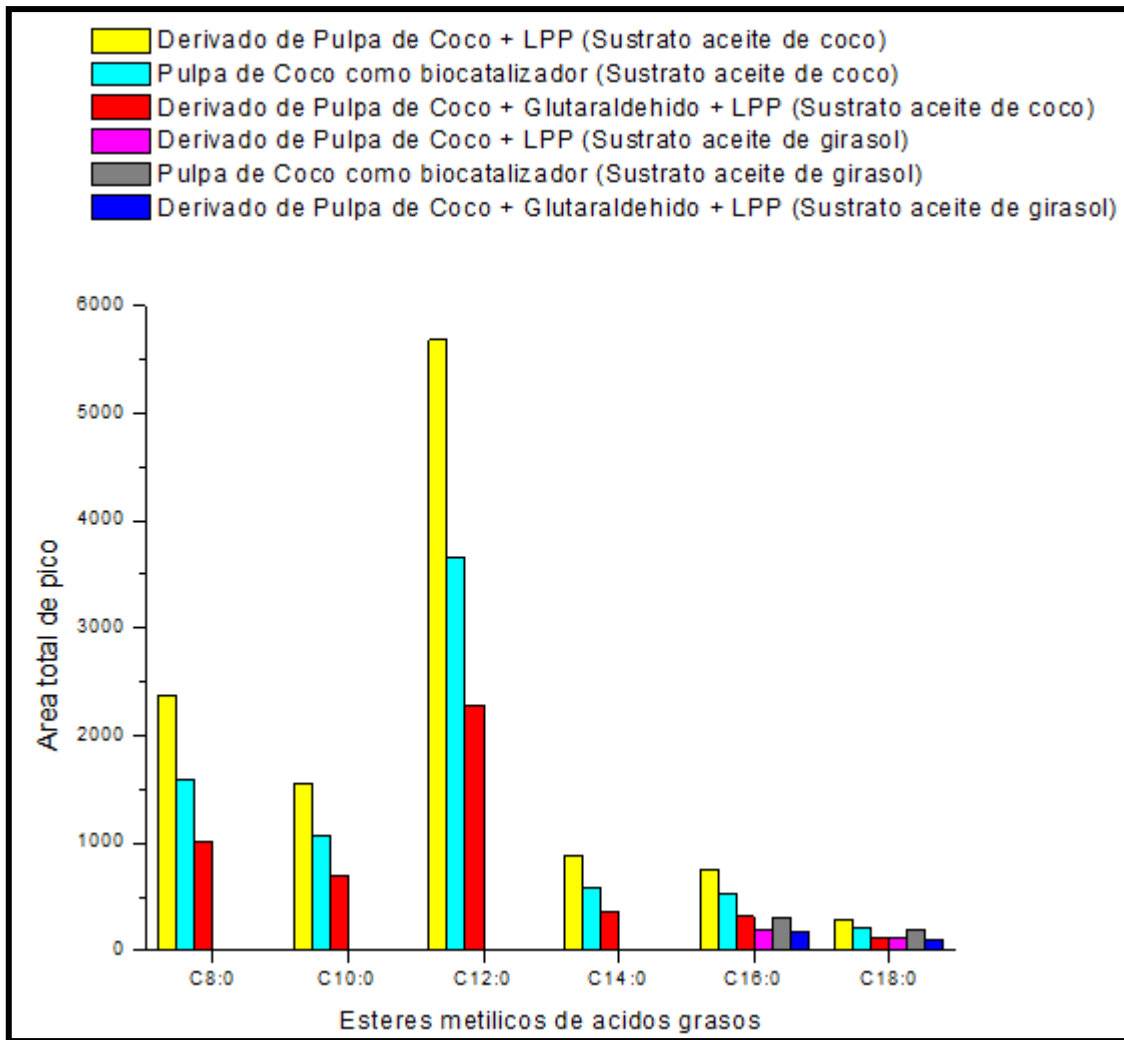


Gráfico del **2do. ciclo de conversión biocatalítica** para la forma C en presencia de aceite de coco + metanol a 38,5°C y 100 RPM para 14 horas de reacción

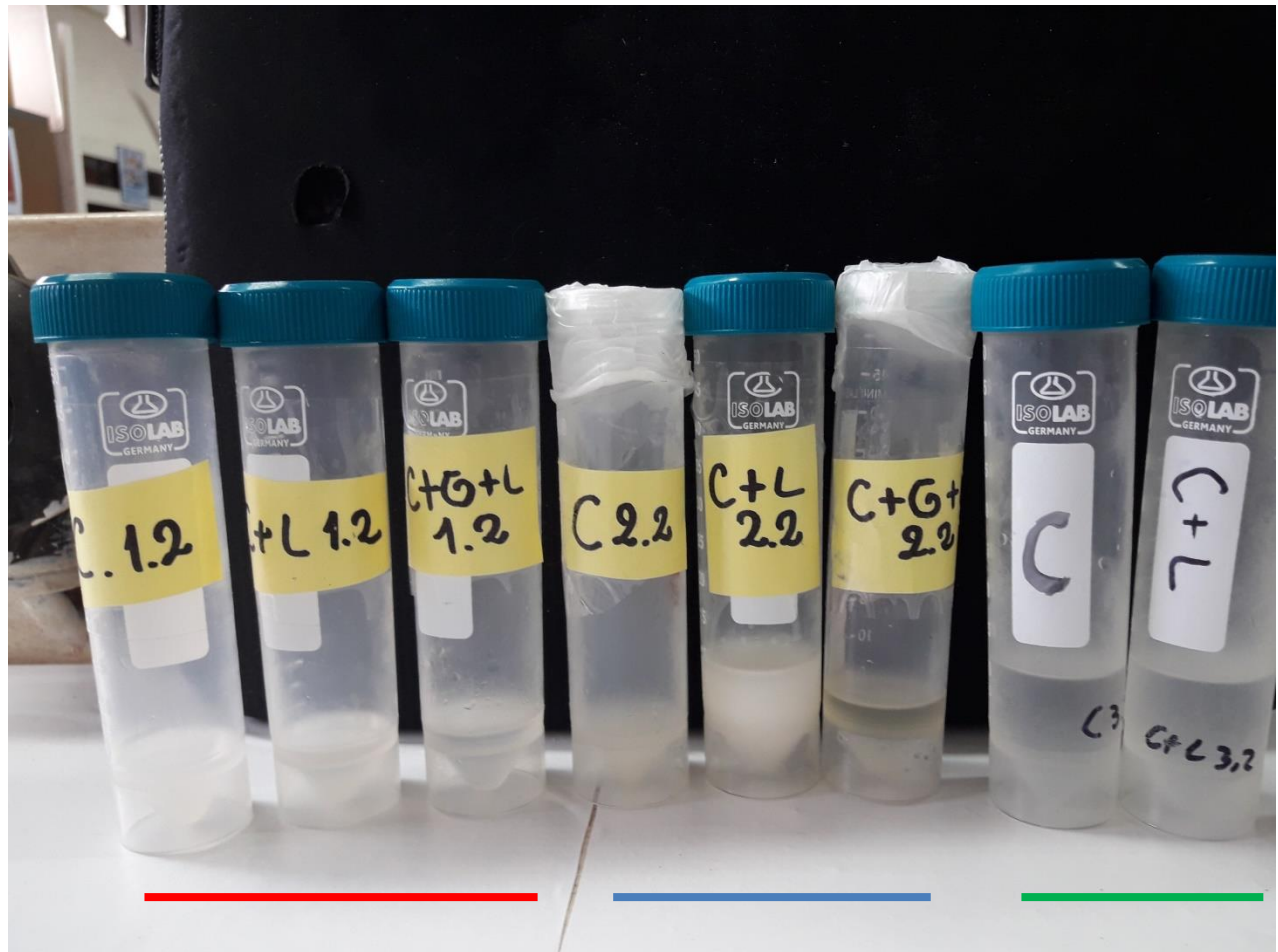
Comparación del % de ésteres de ácidos grasos de cadenas cortas y largas formados al aplicar los biocatalizadores sobre los sustratos de aceite de coco y girasol por en 14 horas de reacción, a 38,5°C y 100 RPM y primer ciclo de biocatalisis

<u>Inmovilizados de LPP</u>	<u>Aceites</u>	<u>C8:0</u>	<u>C10:0</u>	<u>C12:0</u>	<u>C14:0</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>
<b>LPP sobre fibra</b>	Coco	15	10	36	6	5	2
	Girasol	-	-	-	-	9	5
<b>LPP sobre fibra con glutaraldehido</b>	Coco	13	9	30	5	4	2
	Girasol	-	-	-	-	9	5
<b>Fibra de pulpa tratada</b>	Coco	17	11	38	6	6	2
	Girasol	-	-	-	-	10	6



1er. ciclo catalitico

# Glicerol



6 meses de  
productividad

1er.ciclo

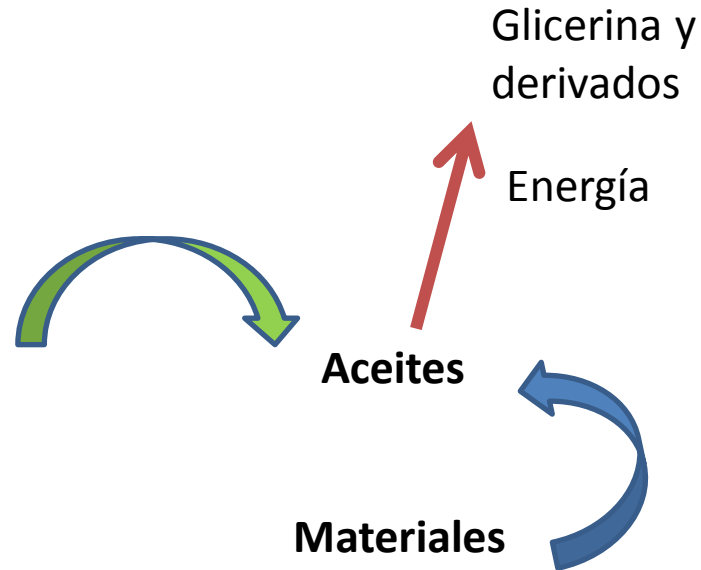
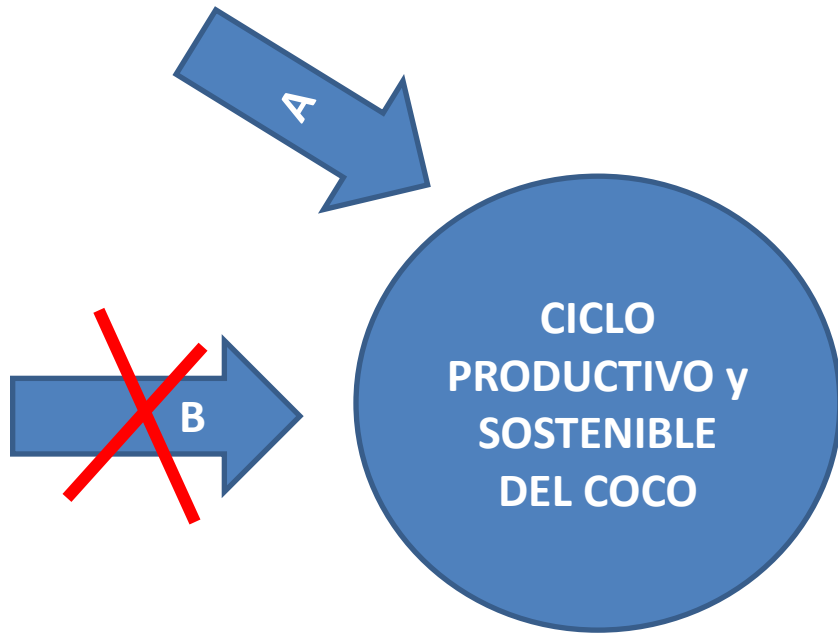
2do. ciclo

3er.ciclo

# Ensayos preliminares de glicerol

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	Girazol FQZ	Coco FQZ	CALIBRACION
ASPECTO	Líquido viscoso, claro, coloreado, inodoro	Líquido viscoso, amarillo pálido, inodoro	Líquido viscoso, con partículas en suspensión, solidifica a temperaturas menores a 20°C aprox.	
INDICE DE REFRACCION	1,4746 ( a 25°C)	1,4710 (a 25°C)	1,4546 (a 25°C)	1,3320 <sub>H2O</sub> (20°C) 1,6555 <sub>MBN</sub> (20°C)
PUNTO DE FUSION	17,8°C	17,2°C	16,8°C	-





- Biocatalizadores
- Ingrediente húmedo de formulaciones alimenticias

Que es lo que proponemos???



**Dra. Fatima Yubero**

Dpto. Físicoquímica (FCQ-UNA)

Bioq. Marcelo López

F. Rosa Degen

Dpto. Botánica (FCQ-UNA)

Dra. Yenny Gonzalez

Dra. Jacqueline Arguello

Instituto de Química UFRGS

Dra. Magna Monteiro

Laboratorio de Biomateriales (FP-UNA)



**Docentes colaboradores**

Lic. Sergio Rodriguez

Laboratorio de Biocombustibles y Lubricantes (INTN)

Lic. Walter Thompson

Dpto. Física. UFL-Brasil

Dra. Sonia Fretes

LABCOM FCQ-UNA

**Iniciación Científica asignados en el proyecto**

Juan Ayala

(B) FCQ

Cynthia Bernal

(B)FCQ

Teresa Melgarejo

(B) FCQ

Sergio Franco

(B)FCQ

Natalia Ayala

(QI) FCQ

Leslie Matto

(IM) FP





# Agradecimientos



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA



*La ciencia es una brecha en el conocimiento*

*Alberto Yanosky*

