

Polvo insoluble de pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) como biocatalizador

Fatima Yubero^{a,*}, Juan Ayala^a, Marcelo López^a, Victoria Valdovinos^a, Cyntia Bernal^a, Yenny González^b

^a Dpto. de Físicoquímica/Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

^b Dpto. de Botánica/Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

*E-mail: fyubero@qui.una.py

RESUMEN

El fruto de *Acrocomia aculeata* (coco) se usa para obtener aceites que puedan extraerse de la pulpa y almendra. La extracción del aceite de pulpa es un proceso que se realiza por prensado quedando restos que finalmente se desechan. El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades biocatalíticas y fisicoquímicas del desecho de la pulpa de coco para aplicarlo bajo condiciones sólida e insoluble como biocatalizador heterogéneo. Para ello se obtuvo un polvo insoluble de pulpa de coco siguiendo un proceso de obtención no convencional. Se determinó las propiedades fisicoquímicas mediante métodos estandarizados de análisis y se evaluó la actividad lipasa "per se" de este polvo insoluble comparándolo con la actividad de lipasas inmovilizadas comerciales en la reacción de hidrólisis de una emulsión (O/W) 0,5% de Tween 80 (polioxi-etileno sorbitan monooleato). Paralelamente se evaluó la actividad lipasa de la pulpa de coco en forma de extracto soluble. Como resultado se observó que el polvo de pulpa de coco obtenido por el método no convencional presentó menor contenido de humedad y de acidez que el obtenido por el método tradicional. El polvo de pulpa de coco obtenido y tratado con alcoholes con grado decreciente de polaridad resultó ser biocatalítico "per se" obteniéndose actividad comparable con las lipasas comerciales evaluadas. La actividad en los extractos crudos solubles fue menor a la del polvo insoluble de pulpa. La actividad biocatalítica "per se" del polvo de pulpa de coco podría aplicarse a procesos biocatalíticos para reducir costos y en sistemas no convencionales.

Palabras clave: polvo, pulpa de coco, biocatalizador

ABSTRACT

The fruit of *Acrocomia aculeata* (coco) is used to obtain oils that may be extracted from the pulp and almond. Pulp oil extraction is a process that is performed by pressing remaining residues that are, finally, discarded. The objective of this study was to evaluate the biocatalytic and physico-chemical properties of these coconut pulps residues to apply them under solid and insoluble conditions as heterogeneous biocatalysts. For these purpose an insoluble powder of coconut pulp was obtained following a non-conventional process. It were determined the physico-chemical properties using standardized methods of analysis and it was assessed the lipase activity "per se". The activity of this insoluble powder was compared to the activity of commercial immobilized lipases in the reaction of hydrolysis of a 0,5% (O/W) Tween 80 emulsion (polyoxyethylene sorbitan monooleate). At the same time it was assessed the lipase activity from the coconut pulp in the form of soluble extract. It was observed that the powder from coconut pulp obtained by non-conventional method presented lower humidity and acidity levels. The obtained coconut pulp powder was treated with alcohols with decreasing degree of polarity turned out to be biocatalytic "per se" and it was observed similar activity comparing with evaluated commercial lipases. The soluble crude extracts activity was lower than the insoluble pulp powder one. Powder coconut pulp "per se" biocatalytic activity can be used to decrease biocatalytic processes costs and in unconventional systems.

Keywords: powder, coconut pulp, biocatalyst

1. Introducción

Se estima que el Paraguay cuenta con 5 a 6 millones de plantas de cocotero (*Acrocomia aculeata*) y esto representa una cosecha potencial de 120.000 a 160.000 toneladas de frutos/año. De acuerdo a estudios realizados los frutos maduros del cocotero (coco) pueden aportar los siguientes rendimientos; aceite de pulpa (6%), aceite de almendra (5%), tortas diversas (21%), carozo (35%) y epicarpio (18%) [1]. Estos últimos porcentajes nos llevan a estudiar las potencialidades existentes en la pulpa de coco debido al tamaño total que esta ocupa en el fruto, aproximadamente de 40%.

En Paraguay el coco se utiliza principalmente como fuente de aceite de almendra y pulpa para la producción de jabones aunque es ampliamente conocido su uso como combustible y otros elementos que son comercializados como abono y artesanía. Sin embargo, existe desde el punto de vista social y económico la necesidad de aumentar al máximo el valor agregado de los productos del coco pues este rubro constituye un ingreso adicional para las familias campesinas [2].

Luego de la extracción del aceite se estima que el 70% de la pulpa se desecha por ello se consideró el estudio de las propiedades de esta pulpa como matrices catalíticas o bien como soporte de enzimas. La caracterización fisicoquímica del polvo de la pulpa ampliaría y cerraría el ciclo productivo del aceite de coco y la generación de bioproductos a partir de este. En la búsqueda de actividad biocatalítica se han podido superar los inconvenientes de generación de bioproductos rentables gracias a la preparación de derivados inmovilizados de enzimas [3].

Ciertas matrices de fuente natural pueden resultar interesantes y podrían poseer actividad enzimática por sí mismas favoreciendo algunas reacciones bioquímicas. En esta búsqueda las lipasas constituyen enzimas, que cualquiera que sea su origen biológico tienen por función natural la hidrólisis de triglicéridos de ácidos grasos y manifiestan su versatilidad pues se ha descrito en la literatura científica la capacidad de las lipasas de catalizar la síntesis e hidrólisis de ésteres y amidas de una gran variedad de ácidos carboxílicos, alcoholes y aminas incluso utilizando medios no convencionales [4].

En este estudio se evaluó la aplicación del polvo de la pulpa de coco como matriz biocatalítica por sí misma al considerar la

actividad lipasa inicial de la pulpa bajo condiciones de extracto soluble.

2. Experimental

Para el logro de los objetivos se colectaron frutos del cocotero de un bosque nativo perteneciente al Dpto. de Cordillera, Paraguay, obteniéndose cocos en buen estado fitosanitario. Una muestra de herbario se conservó en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción. Para la obtención de la pulpa de coco los frutos fueron procesados siguiendo dos procesos tecnológicos diferentes, el modo convencional por pelado directo de los frutos (Proceso A), y otro, por un pre-secado de los cocos por 48 horas a 60°C y luego pelado (Proceso B).

Una vez obtenida la pulpa por ambos procesos se realizaron y compararon las medidas de los parámetros fisicoquímicos como así también estudios de los grupos funcionales presentes por espectrometría infra roja con transformada de Fourier (IRTF). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado siguiendo métodos estandarizados de análisis. Se determinó porcentaje de humedad de acuerdo al método GAFTA 2:1:2014, porcentaje de grasa de acuerdo al método GAFTA 3:0:2014, acidez de acuerdo al método de AOCS Ca 5a-40, cenizas de acuerdo al método GAFTA 11:0:2014, cenizas insolubles de acuerdo al método GAFTA 12:0:2003, cantidad de fósforo por el método espectrofotométrico A.O.C.S. Ca 12-55, carbohidratos por el método de la antrona, fibra bruta por el método GAFTA 9:0:2014, proteínas por el método GAFTA 3:0:2014 [5] y la capacidad calorífica del material mediante una bomba calorimétrica. Posteriormente se realizaron ensayos de solubilidad de la pulpa obtenida por el proceso B.

Para evaluar la actividad lipásica de la matriz de pulpa de coco se preparó una matriz de pulpa insoluble para luego ensayarla en un medio que utilizó una emulsión al 0,5% (O/W).

Paralelamente se determinó la actividad lipasa de la pulpa de coco bajo condiciones aun solubles. Para la preparación del extracto enzimático se empleó el método propuesto por Molina Tizo y col. [6] modificada.

3. Resultados y discusión

Con el fin de obtener matrices de pulpa de coco insolubles para ser aplicadas en procesos catalíticos hemos utilizado un proceso

tecnológico de obtención de la pulpa diferente al utilizado convencionalmente. El proceso convencional de extracción obtiene la pulpa bajo condiciones de alta humedad y solubilidad en medio acuoso. Con el proceso tecnológico B se pre-secaron los frutos enteros del coco para la obtención de la pulpa lográndose un polvo con una reducción del 81,1% de humedad, aumento de su insolubilidad en soluciones tampón y en solventes orgánicos, aumento de su concentración en fibra bruta y mejoramiento en los rendimientos de obtención por Kg de fruto (Tabla 1).

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

La determinación de grupos funcionales presentes en el polvo de la pulpa de coco se realizó por IRTF para lo cual se pesaron 2 mg de muestra de pulpa seca de coco en 300 mg de KBr para obtener una mejor resolución de los picos. Se mezclaron y trituraron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Los espectros de IRTF demostraron que el material obtenido de la pulpa de coco presentaba alargamientos de enlaces dobles conjugados y aromáticos y alargamientos de enlace doble nitrógeno oxígeno C=N/N=O que aparecían en los picos 1425 y 1635 cm^{-1} respectivamente. De acuerdo a lo obtenido en el espectro infrarrojo, los grupos carbonílicos en la muestra probablemente pertenezcan a ácidos grasos y ésteres. En estudios realizados con anterioridad por Oberlaender y col. [7]

determinaron la presencia de β -carotenos y ácidos grasos. La presencia de pigmentos solubles en todo tipo de solvente nos llevó a despigmentar la pulpa realizando varios lavados con isobutanol y *t*-butanol. El *t*-butanol es un alcohol utilizado como cosolvente en reacciones biocatalíticas no convencionales que involucran las medidas de actividad lipásica en la búsqueda de biocombustibles[8].

Esta matriz sólida de la pulpa, despigmentada e insoluble en solventes acuosos y orgánicos fue utilizada para realizar los estudios de su actividad biocatalítica “*per se*” en medio acuoso. Para la determinación de la actividad biocatalítica se procedió a evaluar la actividad lipasa de esta matriz, para lo cual se aplicaron 300 mg de polvo de pulpa de coco utilizándose como sustrato una emulsión al 0,5% (O/W) de Tween 80. Se realizaron blancos de emulsión y todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Como resultado se pudo comprobar la hidrólisis del éster seguida por la formación de ácidos grasos en el medio de reacción. El producto de reacción expresado en Eq/L de H^+ generados fue contrastado con la hidrólisis favorecida por los biocatalizadores comerciales de CAL-B (lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina macroporosa) y la lipasa de *Rizomucor mihei* inmovilizada. La matriz de pulpa de coco resultó ser totalmente estable e insoluble bajo las condiciones de ensayo, inclusive aplicándola durante 24 horas.

Al comparar los distintos tipos de biocatalizadores, ensayados bajo las mismas condiciones, se ha observado una homología en la generación de ácidos grasos del 99,6% cuando se utilizó la matriz de pulpa de coco con respecto a la lipasa comercial CALB; 58,7% con respecto a la lipasa inmovilizada de *Rizomucor mihei* y 31,7% con respecto a la lipasa pancreática cuando esta es inmovilizada sobre matriz de pulpa de coco (Tabla 2). Varios estudios biocatalíticos consideran al aceite obtenido de fuentes naturales en la búsqueda del valor agregado a un rubro agrícola [9]. Sin embargo, en este sentido, las matrices desechadas desde estas mismas fuentes aun han sido poco exploradas.

Paralelamente con el extracto crudo soluble de la pulpa se realizaron determinaciones de la cantidad de ácidos grasos producidos por el desdoblamiento de los ésteres presentes en la emulsión O/W(0,5%) de Tween 80, para lo cual se utilizó una solución de NaOH 1,4307 mM como

valorante obteniéndose 0,001674 Eq/L de H⁺ de ácidos grasos. La mezcla estaba constituida por 25% de extracto crudo de pulpa de coco, 50% de sustrato (emulsión de Tween 80) y 25% de 100 mM de buffer PBS pH 7 a 25°C.

Tabla 2: Ácidos grasos formados expresados como Eq/L de H⁺ generados en la reacción de hidrólisis de una emulsión 0,5% (O/W) Tween 80 en medio heterogéneo a 25°C

Catalizador	Eq/L de H ⁺
Matriz de pulpa de coco	0,0030
Inmovilizado de lipasa pancreática s/matriz de pulpa	0,0042
Lipasa inmovilizada de <i>C. antártica</i> CAL-B	0,003012
Lipasa inmovilizada de <i>R.mihe</i>	0,00511

Al comparar los valores medios de la cantidad de ácidos grasos producidos al utilizar el extracto crudo de pulpa y la matriz insoluble se observó una mayor actividad “*per se*” en las matrices insolubles en comparación al extracto crudo ($p \leq 0.05$), esto añade la posibilidad que la forma de obtención de la pulpa sea un factor importante en la activación de la actividad catalítica de la lipasa presente en la matriz.

4. Conclusiones

Los ensayos preliminares en la búsqueda de la actividad biocatalítica “*per se*” de la pulpa de coco en medio heterogéneo abre la posibilidad de aplicarla a procesos biocatalíticos de menor costo y en medios no convencionales que permitiría explorar la generación de bioproductos, así como el aumento de su actividad o de una actividad secundaria de derivados inmovilizados de enzima sobre esta matriz.

5. Agradecimientos

Este Proyecto es financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación – FEEI del FONACIDE.

Los autores de este artículo agradecen a la empresa CONTROL UNION, Paraguay y así mismo a las profesoras QF. Rosa Degen y Bioq. Clin. Clara Nuñez.

6. Referencias

1. J. A, Lopez y colaboradores. Árboles comunes del Paraguay. Ñande yvyra mata kuera. Cuerpo de Paz. Colección de intercambio de Información. Asunción, 1987. 35 p
2. C.J., Cardozo Román. KA“AGUY Revista Forestal del Paraguay: 12 (1) 1996.
3. B. Brena y F. Batista-Viera. En: Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Segunda Edición. Guissan Humana Press Inc, NJ 2005.
4. A. Ivanov. y M. Schneider. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 3:6, (1997) 303-309.
5. GAFTA. Sampling Rules No. 124 (Incorporating the Methods of Analysis Form No. 130). 2014. Rules for sampling, analysis instructions, methods of analysis and certification. England. URL: www.gafta.com.
6. N. Molina Tizo; M. T. Cruz & V. I. Anaya Sosa. En Anales del VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Acapulco, Guerrero, México. 2010.
7. D. Oberlander & E. Bohn. *Acrocomia aculeata*: su potencial como cultivo para múltiples propósitos. Ed. 2009. Agroenergía S.R.L. Paraguay.
8. D. Royón, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. 2007. Bioresource Technology 98 (2007) 648-653.
9. J. Ching Juan y col. 2011. Biodiesel production from Katropha oil by catalytic and non catalytic approaches: An overview. Bioresource Technology 102 (2011) 452-460.

