



XX CAC 2017

CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017
CORDOBA-ARGENTINA

Derivados inmovilizados de lipasa pancreática sobre matrices de pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) para la obtención de esteres metílicos

Ayala, Juan¹, López, Marcelo¹, Rodríguez, Sergio², González, Yenny¹, Arguello, Jacqueline³, Yubero, Fatima^{1*}

¹Departamento de Físicoquímica/Universidad Nacional de Asunción/ Facultad de Ciencias Químicas/ Campus Universitario San Lorenzo. San Lorenzo. Paraguay

²Laboratorio de Biocombustibles y Lubricantes/Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN). Avda. Artigas 3973. Asunción. Paraguay

³Instituto de Química/ Universidad Federal de Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil

*fyubero@qui.una.py

Palabras Claves: pulpa, soporte, lipasa, esteres metílicos

Resumen

La inmovilización enzimática es un proceso que lleva al confinamiento de la enzima en una región del espacio delimitado. El objetivo de este trabajo fue desarrollar derivados inmovilizados de lipasa pancreática porcina comercial sobre matrices de pulpa de coco para la obtención de ésteres metílicos.

Se obtuvo el polvo de pulpa de coco para su aplicación como soporte de inmovilización. Se elaboraron dos tipos de soportes, uno sin modificación y otro activado con glutaraldehído al 1,5% v/v. Se inmovilizó 40 mg/mL de enzima (gramo de soporte)⁻¹ en ambos sistemas a partir de los cuales se evaluó el porcentaje de retención por proteínas totales y actividad lipasa. Antes y después de la inmovilización se determinaron los grupos funcionales y elementos químicos por IR y EDX respectivamente; y observación de la superficie por MEB.

Se determinó la funcionalidad de los derivados inmovilizados ejecutando pruebas biocatalíticas de transesterificación enzimática utilizando aceites vegetales (coco y girasol) en presencia de metanol como sustratos y *t*-butanol como cosolvente. El derivado sin glutaraldehído retuvo una menor cantidad de enzima, sin embargo, su funcionalidad fue superior luego de la biosíntesis de ésteres metílicos. Con este inmovilizado se obtuvo mayor rendimiento de esteres metílicos determinados por GC-FID utilizando como sustrato aceite de coco.

Abstract

Enzyme immobilization is a process that leads to the confinement of the enzyme in a region of space delimited. The objective of this work was to develop immobilized derivatives of commercial pig pancreatic lipase on coconut pulp fiber for obtaining methyl esters.

The coconut pulp powder was obtained for application as immobilization support. Two types of supports were made, one without modification and the other activated with 1.5% v/v glutaraldehyde. 40 mg/mL of enzyme (grams of support)⁻¹ was immobilized in both systems from which the percentage of retention by total proteins and lipase activity was evaluated. Before and after immobilization functional groups and chemical elements were determined by IR and EDS respectively; and surface observation by SEM.

The functionality of the derived immobilized was determined by performing biocatalytic tests of enzymatic transesterification using vegetable oils (coconut and sunflower) in presence of methanol as substrates and *t*-butanol as co-solvent. The derivative without glutaraldehyde retained a lower enzyme yield, however, its functionality was higher after the biosynthesis of methyl esters. With this immobilized, higher yield of methyl esters determined by GC-FID was obtained using coconut oil as substrate.



XX CAC 2017

CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017
CORDOBA-ARGENTINA

Introducción

Las industrias que utilizan los frutos del cocotero de la especie *Acrocomia aculeata*, de masivo desarrollo nativo en Paraguay, es con el propósito de obtener principalmente el aceite de almendra utilizado en cosmética aunque se halla en fase de exploración sus potencialidades para la obtención del aceite de pulpa con fines de producción de biocombustibles [1]. Sin embargo, los desechos de pulpa derivados de estos procesos, si bien son utilizados como alimento para ganado vacuno y porcino, no son bien remunerados al productor primario. Sin embargo, nuevos productos que se pudieran obtener a partir de la pulpa de coco podrían desarrollarse con el fin de reciclar estos y utilizarlos como materiales para la producción sustentable de biocombustibles.

De acuerdo a la bibliografía el polvo de pulpa de coco presenta beta carotenos [2], $17,2 \pm 0,49\%$ de fibra bruta en base seca y $1,57 \pm 0,57\%$ de proteínas en los frutos enteros [3]. La pulpa podría aportar el 40% de fibra bruta en base seca dependiendo del tipo de proceso de obtención [4], además son insolubles en solventes orgánicos [5]. Sin embargo, a pesar de su contenido en fibras y proteína, este desecho ha sido poco estudiado para su aplicación industrial como matriz de inmovilización de enzimas.

La lipasa pancreática porcina (LPP) es una enzima de bajo costo que al igual que otras lipasas actúan sobre acilglicérols con 10 o más carbonos; considerados de cadena larga [6]. Una de sus características fundamentales es su activación en presencia de interfases hidrofóbicas denominada activación interfacial la cual puede ser promovida por un gran número de interfases de tipo hidrofóbico entre las que se pueden mencionar burbujas de gas, proteínas de carácter hidrofóbico, lipopolisacáridos, gotas de aceite o soportes con superficies hidrofóbicas [7].

Las lipasas inmovilizadas no sólo llevan a cabo reacciones hidrolíticas, sino que también esterifican, realizan acidólisis, alcoholólisis entre otras reacciones [8]. Estas reacciones pueden tener lugar en medios acuosos (convencionales) u orgánicos (no convencionales), actúan sobre sustratos específicos y catalizan biotransformaciones selectivas en cuanto al enantiómero se refiere [9]. Su versatilidad aumenta en estado inmovilizado; por lo cual constituyen las enzimas de elección, haciéndose posible su uso repetido mediante el diseño de reactores aplicables a la industria como la de obtención de biocombustibles [9].

El principal enfoque de este trabajo fue desarrollar derivados inmovilizados de lipasa pancreática porcina sobre matrices de pulpa de coco para la obtención de ésteres de metilo (biodiesel) y que sean aplicables en la reacción de transesterificación enzimática de ésteres de ácidos grasos en presencia de metanol facilitada por la adición de cosolvente.

Experimental

La fibra de pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) fue obtenida con un molino de cuchillas y tamizada hasta lograr un tamaño de partículas $\leq 500 \mu$. Este material fue despigmentado utilizando isobutanol y *t*-butanol [5]. Se elaboraron dos tipos de soportes de inmovilización para la LPP, uno sin modificación química y otro activado con glutaraldehído al 1,5% v/v a 25°C durante 24 horas en un rotor de tubos a 8 RPM para lo cual se utilizó una solución de 40 mg/mL de la enzima por gramo de soporte.

La presencia y los cambios de grupos funcionales presentes antes y después de la inmovilización fue determinada por espectroscopia infra roja utilizando 2 mg de fibra de pulpa de coco seca mezclados con 300 mg de KBr [10]. Así mismo, se observaron los cambios en superficie mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) y por espectroscopia de energía dispersiva (EDX) se realizó análisis químico elemental en superficie.



XX CAC 2017

CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017
CORDOBA-ARGENTINA

En ambos soportes se evaluó el porcentaje de retención de la lipasa pancreática porcina por proteínas totales utilizando un método colorimétrico cuantitativo [11] y por actividad de enzima siguiendo el método del ácido ditionitrobenzoico (DTNB). Posteriormente se determinó la funcionalidad de los derivados inmovilizados ejecutando pruebas biocatalíticas de transesterificación enzimática en un bioreactor de 200 mL a 35°C y a 189 RPM utilizando aceites vegetales - coco (*Acrocomia aculeata*) y girasol -; y metanol como sustratos; así también *t*-butanol como cosolvente de acuerdo al método propuesto por Royón y col., 2007[9]. La determinación del rendimiento de ésteres de metilo fue seguida mediante un equipo de cromatografía gaseosa equipado con detector de ionización de llama (GC-FID). Previamente a las pruebas de retención de la LPP sobre la superficie de la fibra y las pruebas biocatalíticas, los derivados inmovilizados fueron activados a 60°C por 24 horas en estufa y una vez secos guardados a 4°C para su conservación. Los reactores enzimáticos fueron de régimen discontinuo consistentes en frascos Erlenmeyer de 200 mL con tapa rosca conteniendo 215 mg de los biocatalizadores.

La reacción enzimática se llevó a cabo utilizando 1,22 g de aceite vegetal (aceite de coco de la misma especie *Acrocomia aculeata* y por otro lado aceite de girasol), como primer sustrato en medio terbutanólico (15 mL), se adicionó 0,6 mL de metanol como segundo sustrato, se mezclaron todos los reactivos y la reacción se dejó transcurrir durante 4 horas en un agitador termostatzado MaxQ 4450 a 38,5°C y agitación constante a 189 RPM, posteriormente se adicionaron otros 0,6 mL de metanol y finalmente la reacción transcurrió unas 10 horas más [11]. Una vez finalizada la reacción e inyectada la muestra se identificaron los picos por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama (FID), posteriormente sus tiempos de retención fueron comparados a los tiempos de retención de un estándar externo correspondiente a una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (RM-5 de Supelco). Se utilizó el software Chem Station versión B.03.01-SR1 para la integración de áreas de pico [12].

Resultados y discusión

Las fibras secas de pulpa de coco obtenidas por despigmentación [5] fueron analizadas por espectroscopia infraroja con el fin de determinar los grupos funcionales presentes. Las determinaciones se realizaron antes y después de la inmovilización de la lipasa pancreática porcina sobre los soportes con y sin glutaraldehído. Los número de ondas observados se describen en Tabla 1;

Tabla 1: Números de onda de espectros IR de las fibras de coco y de los derivados de LPP inmovilizados

Números de onda IR (cm ⁻¹)	3500	2920	1730	1030 y 1060
	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
Fibra nativa		X		X
Fibra decolorada	X	X		X
LPP sobre fibra decolorada	X	X	X	X
LPP sobre fibra decolorada activada con glutaraldehído	X	X		X

Al comparar pulpa nativa y decolorada se observa la aparición de picos en 3500 y 1060 cm⁻¹ que corresponden a alargamientos de N-H no asociados, además grupos funcionales en tensión de C-O-C y C=N luego de decolorar la fibra. Así mismo, en el inmovilizado de LPP sobre fibra decolorada aparecieron picos en la zona de 1700 cm⁻¹ correspondiente a estiramientos C=O. La intensidad así

como la definición de la señales al espectro IR de este derivado inmovilizado se ve favorecida por la presencia de alargamientos de N-H no asociados y estiramiento C-H alargamientos N-H⁺ que son grupos funcionales útiles en la inmovilización multipuntual de la proteína formandose bases de Schiff con el glutaraldehído que pudiera redituara en una mayor estabilidad operacional del biocatalizador.

Las observaciones de la superficie de la fibra de pulpa de coco y de los derivados inmovilizados se realizaron por microscopia electrónica de barrido (MEB) (Fig. 1) observándose una superficie más compacta al activarla con glutaraldehído e inmovilizarla con LPP. Sobre esta superficie se aplicó la técnica de espectroscopia de energía dispersiva) (EDX) obteniéndose el análisis químico elemental de la fibra que se comparó con el de la enzima sola y de los inmovilizados (Tabla 2).

La espectroscopia de energía dispersiva (EDX), demostró que disminuyó la concentración del elemento carbono en la superficie de la muestra después de la decoloración de la fibra y que una vez inmovilizada la LPP aumento el porcentaje de nitrógeno en superficie (Tabla 2).



Figura 1: Microscopia electrónica de barrido (MEB) para las formas de fibra nativa, despigmentada y de los derivados inmovilizados

Tabla 2: Análisis químico elemental por espectroscopia (EDX) de la superficie de Lipasa pancreática porcina (LPP), fibra de pulpa de coco y derivado inmovilizado

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

Posteriormente se realizaron las evaluaciones de retención por proteína y retención por actividad enzimática de los derivados inmovilizados de LPP sobre pulpa de coco. Los porcentajes de retención de LPP fueron 78% y 64% para las inmovilizaciones sobre fibra en ausencia y en presencia de glutaraldehído respectivamente; y de 14% por actividad de enzima en ambos casos. Es probable que la presencia de enlaces covalentes entre los grupos aminos de la lipasa y la pulpa con los grupos carbonilos del glutaraldehído haya generado una estabilidad soporte enzima evitándose la difusión de proteína al medio sobrenadante que conlleva a una disminución de los porcentajes de retención tal como lo habían indicado Chaichi y colaboradores [13]. Es probable que al no llevarse a cabo la reducción del glutaraldehído utilizado para la modificación química de la matriz eso haya generado la disminución de la libertad del movimiento de la enzima inmovilizada con lo cual su actividad se vio reducida. Otra de las causas probables de la disminución de la retención de actividad con el soporte



XX CAC 2017

CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017
CORDOBA-ARGENTINA

activado haya sido el bloqueo del sitio activo por parte del glutaraldehído impidiéndose así el acceso del sustrato al sitio catalítico. En los trabajos realizados por Hayat [14] se observó que los aldehídos ejercen una acción y efecto importante sobre la actividad de las enzimas durante el proceso de inmovilización, si esa concentración no se ve controlada el exceso de aldehído puede generar una activación desmedida de grupos reactivos en la unión enzima soporte, lo que daría lugar a una inhibición enzimática por la generación de un efecto negativo sobre la morfología enzimática.

Finalmente, luego de aplicar los derivados inmovilizados de LPP en la reacción de transesterificación enzimática para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos se observó que todos los derivados inmovilizados de LPP fueron catalíticos utilizando aceites vegetales (coco y girasol) y metanol como sustratos. El aceite de coco posee gran cantidad de esteres de ácido láurico y está más bien está constituido de ácidos grasos de cadena corta [3], sin embargo, el aceite de girasol posee ácidos grasos de cadena larga. Los resultados de la capacidad de biotransformación de los derivados inmovilizados se observa en la Tabla 3.

Marty en el año 1985 [15] mencionó que la disminución de la actividad debido al número elevado de enlaces covalentes también puede conducir a una desnaturalización de la enzima a causa de la aparición de modificaciones en la conformación y rigidez del soporte. En este sentido los derivados sin modificación con glutaraldehído fueron más activos. Esto último hace que en la industria del coco puedan obtenerse soportes de LPP a partir de la misma pulpa, que no requieran modificación química lo que constituye algo promisorio sobre todo por el bajo costo.

Tabla 3: Comparación del % de esteres de ácidos grasos de cadenas cortas y largas formados al aplicar los derivados inmovilizados de LPP sobre los sustratos de aceite de coco y girasol por 14 horas de reacción, a 38,5°C y 189 RPM

Inmovilizados de LPP	Aceites	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0
LPP sobre fibra decolorada	Coco	15	10	36	6	5	2
	Girasol	-	-	-	-	9	5
LPP sobre fibra decolorada con glutaraldehído	Coco	13	9	30	5	4	2
	Girasol	-	-	-	-	9	5

En la Tabla 3 se observa que ambos derivados inmovilizados fueron más específicos para ácidos grasos de cadena corta que son característicos del aceite de coco. El aceite de almendra de coco posee gran cantidad de esteres de ácido láurico [3]. Con el aceite de girasol los derivados inmovilizados demostraron tener nula capacidad de biotransformación de esteres de cadena corta. Solo fueron capaces de transformar esteres de cadena larga como C:16 y C:18 presentes en aceite de girasol con porcentaje menor.

Conclusiones

A partir de las fibras de pulpa de coco se elaboraron dos tipos de soporte, uno de ellos activado con glutaraldehído al 1,5% v/v. Al comparar los espectros IR de la pulpa nativa y decolorada se observa la aparición de picos en 3500 y 1060 cm^{-1} que corresponden a alargamientos de N-H no asociados, además grupos funcionales en tensión de C-O-C y C=N luego de decolorar la fibra. Así mismo en el inmovilizado de LPP sobre fibra decolorada aparecieron picos en la zona de 1700 cm^{-1} correspondiente a estiramientos C=O.

Por la técnica de análisis químico elemental de energía dispersiva (EDX) acoplada a la observación de la superficie por MEB se concluyó que hubo disminución de la concentración del elemento carbono en la superficie de la muestra después de la decoloración de la fibra y que una vez inmovilizada la LPP



XX CAC 2017

CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017
CORDOBA-ARGENTINA

aumentó el porcentaje de nitrógeno en superficie. La inmovilización de lipasa pancreática porcina fue evaluada por la retención de actividad enzimática y por proteína. Los porcentajes de retención de LPP fueron 78% y 64% para las inmovilizaciones sobre fibra en ausencia y en presencia de glutaraldehído en la fibra respectivamente; y de 14% por actividad de enzima en ambos casos.

Los derivados inmovilizados de enzima fueron aplicados como biocatalizadores en una reacción de transesterificación enzimática utilizando aceites vegetales (coco y girasol) y metanol como sustratos en cosolvente de *t*-butanol para la producción de ésteres de metilo lográndose mejores esterificaciones con el aceite de coco. Esto último conduce a un ciclo productivo sostenible de ésteres de metilo que por un lado utiliza la misma fibra de pulpa de coco del género *Acrocomia aculeata* como soporte de biocatalizadores de bajo costo y en donde el aceite de coco de la misma especie es un sustrato de la reacción.

Agradecimientos

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

Referencias

- [1] Cardozo Román, C.J.. KA`AGUY Revista Forestal del Paraguay: 12 (1) 1996; p.41-46.
- [2] Oberlander, D.; Bohn, E. *Acrocomia aculeata*: su potencial como cultivo para múltiples propósitos. Ed. 2009. Agroenergía S.R.L. Paraguay.
- [3] Hiane P, Filho M, Ramos M, Macedo M. Bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition. Braz J Food Technol. 2005; v.8 n.3: p.256-9.
- [4] Valdovinos V. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y de procesamiento de la pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) con miras a su aplicación en la industria de los alimentos [Licenciatura]. Facultad de Ciencias Químicas; 2016.
- [5] Yubero, F.; Ayala, J.; Ayala, J.; López, M.; Valdovinos, V.; Bernal, C.; González, Y. Polvo insoluble de la pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) como biocatalizador. Diseño, preparación y caracterización de catalizadores en el Libro de resúmenes del XXV Congreso Iberoamericano de Catálisis. Montevideo (2016) Pg. 49 ISBN: 978-9974-8434-3-1.
- [6] Andersen R, Brask J. Synthesis and evaluation of fluorogenic triglycerides as lipase assay substrates. Chemistry and Physics of lipids. 2016; 19872-79.
- [7] Bassi J, Todero L, Lage F, Khedy G, Ducas J, Mendes A, et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. International Journal of Biological Macromolecules. 2016; 92900-909.
- [8] Mahmood I, Ahmad I, Chen G, Huizhou L. A surfactant coated lipase immobilized in magnetic nanoparticles for multicycle ethyl isovalerate enzymatic production. Biochemical Engineering Journal. 2013; 7372-79.
- [9] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. Bioresource Technology. 2007; 98648-653.
- [10] Chang, R. Fisicoquímica. 3ra edición. Mc Graw Hill. 2008. Mexico
- [11] Watson M, Scott M. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 1995; 41: 343-60.
- [12] Ciconini G. Caracterização de frutos e óleo de Polpa de Macaúba dos biomas cerrado e pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil [Maestría]. Universidade Católica Dom Bosco; 2012
- [13] Chaichi M, Alijanpour S. Glucose chemiluminescence biosensor based on covalent immobilization of enzyme in glutaraldehyde functionalized glass cell and direct coupling of chitosan induced Au/Ag alloy nanoparticles. Journal of Analytical Chemistry. 2016; (2).
- [14] Hayat M. Fixation for electron microscopy. Elsevier. 2012.
- [15] Marty J. Application of response surface methodology to optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. Applied Microbiology & Biotechnology. 1985; 22(2): 88.