



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

25  
ZEJ

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

SISTEMAS DE ATRAPAMIENTO PARA  
ENZIMAS LIPOLÍTICAS

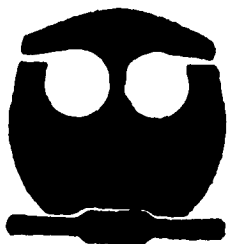
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

RENE JULIO DE LOS RIOS CAMPANELLA



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

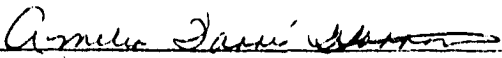
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

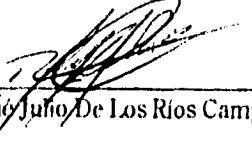
Presidente: Profr. Eduardo Bárzana García.  
Vocal: Profr. Raúl Genaro Aguilar Caballero.  
Secretario: Profra. Amelia María Guadalupe Farrés  
González-Saravia.  
1er. suplente: Profra. María de Lourdes Escamilla  
Hurtado.  
2do. suplente: Profr. Marcos Francisco Báez Fernández.

TRABAJO QUE SE DESARROLLÓ EN EL:  
CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM.

ASESOR.

  
Dra. Amelia María Guadalupe Farrés González-Saravia.

SUSTENTANTE.

  
Refio Juño De Los Ríos Campanella.

Este trabajo está dedicado a:

**DIOS:**

por haberme concedido la capacidad y darme tiempo para realizarlo.

**ROSA AMOR CAMPANELLA RICO**

mujer gracias a la cual lo soy todo, que me brindó la vida y que me ha dado gran parte de su existencia: cuidándome, protegiéndome y apoyándome en todo momento. Por todo y más, gracias MAMÁ.

**A mi padre: RENÉ JULIO DE LOS RÍOS GARDUÑO**

por enseñarme como debe ser un hombre.

**A mi amada hermana: ROCÍO AMOR**

**A GABY ESCOBEDO OLEA**

por haber motivado y darle alegría a mi vida siendo mi compañera, amiga y novia durante la carrera.

Deseo hacer extenso mi agradecimiento a las siguientes personas por las facilidades brindadas para la elaboración del presente trabajo:

Q.F.B. Martha Enequina Jiménez Castañeda

Q.F.B. Aurora Ortega Ávila

Q.F.B. María Antonieta Silva Chávez

Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa

Sra. Lupita Martínez

por todo el apoyo prestado en el Cepario de la Facultad de Química.

Q.F.B. Norma Hilda Vázquez y Claudia Chávez del I.I.B. por los instrumentos proporcionados...¡ah, y por su paciencia!

M. en C. Elpidio García Ramírez por su valiosísima ayuda.

Dr. Raúl Aguilar Caballero

M. en C. Guillermo Molina. Muchísimas gracias por su desinteresada ayuda en el análisis estadístico de esta tesis.

Q.F.B. Sandra López Mungüía

Q.F.B. Mónica Serrano

M. en C. Ángeles Valdivia.

M. en C. Francisca Iturbe Chiñas.

M. en C. Rebeca Ramírez.

Q.A. Ismael Bustos Jaimes, un gran amigo y compañero, por sus consejos y atenciones.

**Doctora en Biotecnología Amelia María Guadalupe Farrés González-Saravia** por su excelente dirección, gran apoyo, comprensión y consejo en la elaboración de esta tesis, así como por su amistad.

Deseo hacer extenso mi agradecimiento a las siguientes personas por las facilidades brindadas para la elaboración del presente trabajo:

Q.F.B. Martha Enedina Jiménez Castañeda

Q.F.B. Aurora Ortegón Ávila

Q.F.B. María Antonieta Silva Chávez

Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa

Sra. Lupita Martínez

por todo el apoyo prestado en el Cepario de la Facultad de Química.

Q.F.B. Norma Hilda Vázquez y Claudia Chávez del I.I.B. por los instrumentos proporcionados...¡ah, y por su paciencia!

M. en C. Elpidio García Ramírez por su valiosísima ayuda.

Dr. Raúl Aguilar Caballero

M. en C. Guillermo Molina. Muchísimas gracias por su desinteresada ayuda en el análisis estadístico de esta tesis.

Q.F.B. Sandra López Mungúía

Q.F.B. Mónica Serrano

M. en C. Ángeles Valdivia.

M. en C. Francisca Iturbe Chiñas.

M. en C. Rebeca Ramírez.

Q.A. Ismael Bustos Jaimes, un gran amigo y compañero, por sus consejos y atenciones.

**Doctora en Biotecnología Amelia María Guadalupe Farrés González-Saravia** por su excelente dirección, gran apoyo, comprensión y consejo en la elaboración de esta tesis, así como por su amistad.

Este trabajo representa la décima parte de mi vida, en la cual he convivido con mucha gente la cual sé que se alegrarán por la culminación de esta tesis, por ello me gustaría nombrarlos. En este momento tengo sus nombres dando vueltas en mi cabeza por lo que para dar un orden a todos iré (como decía Jack "El Destripador"), por partes.

De la carrera: Juan y Ceci, Gaby Escobedo, Adrinita, P.P., Maribela, Alberto (B.B.), Ismahell, Fito y Claudia Y., Armand, Noé, "Gregorio Samsa", Rebeca, Gladys, Licha, Agueda, Iliana, Yazmín, Lorna, Icela, Gaby R., Faby, Oli., "Coatza"

Del "E": Adelfo y Martha, "Chucho" y Tere, Alicia, M<sup>a</sup> Luisa, Laura K., Elsa, Martha M., "Mo querida", Idalia, Rocío S., Rocío, Beatriz, Hugo (Profesor), Eli, Lety, Sandy, July, Bety, Marco y Marce

Del "A": Heyrita y Editha, Tere, Marco V., Claudia S, Fa, Liliana, Karla De la Fuente, Karla De La Mora, Juan Carlos C., Cinthya, Caro, Mónica F., Lin, Ivonne, , "Richie", "Erich"

Profesores: I.Q. Marcelino Gómez, AME, Daniel P.F., Vicky C., Lucy C., Rocío S., Dulce G., Agustín R., Amanda G., Rut V.

Otros: Eric Porras, Iliana Mata, Mario F., Lorena B., Antonio P., Fidel Bernabé. Rosa Hernández.

## **Oración del Hombre de Ciencia**

**¡Oh DÍOS, dame una visión sin nubes y líbrame de la prisión!**

**Dame el valor de oponerme a toda vanidad y de proseguir,  
lo mejor que pueda y hasta el final, cada una de mis tareas.**

**Dame la voluntad de no aceptar nunca reposo ni homenaje,  
antes de haber podido comprobar que mis resultados  
corresponden a mis cálculos o de haber podido descubrir  
y enmendar mis errores.**

Sinclair Lewis (Dr. Arrowsmith)



## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de atrapamiento para la lipasa de *Candida cylindracea*, utilizando la tecnología de producción de liposomas. Se variaron las proporciones de los ingredientes utilizados para la formación de liposomas, así como la concentración de enzima empleando un diseño factorial 6 X 3. Los componentes utilizados para la formación de los liposomas fueron lecitina, colesterol y dicetilfosfato. Los resultados indican que con todas las proporciones analizadas se obtienen liposomas macrovesiculares. Se evaluó tanto la retención de enzima dentro del sistema de atrapamiento como la actividad lipolítica que presentaba cada uno de estos sistemas a diferentes tiempos. Conforme aumentan las proporciones de los componentes, hay más eficiencia en la retención de la enzima utilizada, siempre y cuando la proporción molar del dicetilfosfato no supere la de colesterol. En dichas condiciones se presentan también los mayores valores de actividad lipolítica. La combinación colesterol-dicetilfosfato actúa como un efector positivo de la actividad de la lipasa atrapada, lo cual no se observa cuando se utilizan estos componentes sin formar una membrana alrededor de la enzima.

**ÍNDICE**

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. GENERALIDADES.....	13
2.1. LIPASAS.....	15
2.2. MICROENCAPSULACIÓN.....	20
2.2.1. LIPOSOMAS.....	22
2.3. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. ESTRATEGIA.....	35
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
7. CONCLUSIONES.....	71
8. BIBLIOGRAFÍA.....	75
APÉNDICE A.....	83

## ÍNDICE GRÁFICAS Y TABLAS

<b>GRÁFICA 1.</b>	Caracterización de la actividad lipolítica de la enzima de <i>Candida cylindracea</i> .....	52
<b>GRÁFICA 2.</b>	Curva patrón elaborada con enzima de <i>Candida cylindracea</i> .....	85
<b>TABLA 1.</b>	Técnicas de microencapsulación.....	21
<b>TABLA 2.</b>	Porcentaje de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> retenida dentro de liposomas multilamelares recién formados para cada concentración de enzima utilizada.....	56
<b>TABLA 3.</b>	Porcentaje de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> retenida en el interior de liposomas multilamelares 144 h después de su formación, para cada concentración de enzima utilizada.....	57
<b>TABLA 4.</b>	Porcentaje de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> perdida del interior de liposomas multilamelares a las 144 h después de formados, para cada concentración de enzima utilizada.....	59
<b>TABLA 5.</b>	Diseño factorial 6 x 3 para evaluaciones de actividad lipolítica.....	60
<b>TABLA 6.</b>	Determinación de actividad lipolítica para cada tiempo de reacción y concentración de enzima utilizada, en la tercera evaluación.....	61
<b>TABLA 7.</b>	Resumen de los Análisis de Varianza efectuados para la evaluación a las 144h para los diferentes tiempos de reacción. Incluye los factores Enzima, Formulación y la interacción entre éstos.....	61
<b>TABLA 8.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a nivel fijo de enzima.....	63
<b>TABLA 9.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a 1 mg/mL de enzima.....	65

---

<b>TABLA 10.</b>	Porcentaje de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> retenida dentro de liposomas multilamelares a la concentración de 1 mg/mL de enzima, 144 h después de formados.....	66
<b>TABLA 11.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones con una concentración inicial de 5 mg/mL de enzima.....	67
<b>TABLA 12.</b>	Porcentaje de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> retenida dentro de liposomas multilamelares a la concentración de 5 mg/mL de enzima, 144 h después de formados.....	67
<b>TABLA 13.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas con una concentración inicial de 1 mg/mL de enzima.....	68
<b>TABLA 14.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas con una concentración inicial de 5 mg/mL de enzima.....	68
<b>TABLA 15.</b>	Actividad lipolítica de la enzima libre de <i>C. cylindracea</i> (1 mg/mL) con distintos componentes.....	69
<b>TABLA 16.</b>	Actividad lipolítica de la enzima libre de <i>C. cylindracea</i> (10 mg/mL) con distintos componentes.....	69
<b>TABLA 17.</b>	Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a nivel fijo de 5 mg/mL de enzima.....	70

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.</b> Reacción general catalizada por lipasas.....	15
<b>FIGURA 2.</b> Representación esquemática de un liposoma multilamelar.....	22
<b>FIGURA 3.</b> Rutas de transformación de liposomas.....	26
<b>FIGURA 4.</b> Diagrama de flujo de la preparación de liposomas multilamelares.....	43
<b>FIGURA 5.</b> Fotografías de liposomas obtenidos.....	54

# 1. introducción

Conforme el Hombre ha evolucionado y cubierto sus necesidades básicas, se ha dedicado a tratar de hacer más placentera su vida. Es así que surgió la elaboración de mejores prendas para cubrirse, bebidas (vino, cerveza, licores, etc.), fragancias, especias, sabores, etc. Por la búsqueda de materias primas para desarrollar estos productos se exploraron y descubrieron nuevas tierras. En las últimas cuatro décadas el desarrollo de sabores ha tenido un gran impacto y se han diseñado numerosas técnicas para extraerlos, aislarlos o crearlos. Una de las maneras más novedosas de crearlos, a la fecha, ha sido mediante la adición de enzimas exógenas a una inmensa variedad de sustratos de cualquier naturaleza. La leche y sus productos, a partir de la grasa y las proteínas, ofrecen materia prima para la obtención de sabores con características lácteas para su aplicación sobre una gran gama de productos alimenticios procesados, no sólo del área láctea. Al aplicarse a leche se ha visto que ocurre una gran pérdida de enzimas debido a que se retienen en su mayor parte en la porción acuosa y en muy poca proporción en la cuajada. La encapsulación de estas enzimas ha mejorado esta retención en la fase grasa, pero se ha visto la necesidad de mejorar estos sistemas de atrapamiento para asegurar su mejor distribución en la fase grasa. La tecnología de liposomas ofrece grandes ventajas para alcanzar dicho objetivo, debido a que éstos se forman con lípidos y ello favorece su retención en la fase grasa de la leche, es por ello que en este trabajo se intenta desarrollar un sistema, empleando un modelo de atrapamiento principalmente para enzimas lipofílicas.

## 2. generalidades



## 2.1 LIPASAS.

### 2.1.1. DEFINICIÓN

Las enzimas lipolíticas o triacilgliceroléster-hidrolasas (E.C.3.1.1.3.) hidrolizan triacilglicerol en una interfase aceite-agua<sup>(9,32,34)</sup>, alcanzando su máxima actividad sólo cuando son adsorbidas en dicha interfase en las condiciones adecuadas<sup>(37)</sup>, dando como producto, si la hidrólisis es total, 3 moles de ácidos grasos y 1 mol de glicerol<sup>(4,17,34)</sup> y teniendo como productos intermedios di- y monoacilglicerol<sup>(4)</sup> (Figura 1).

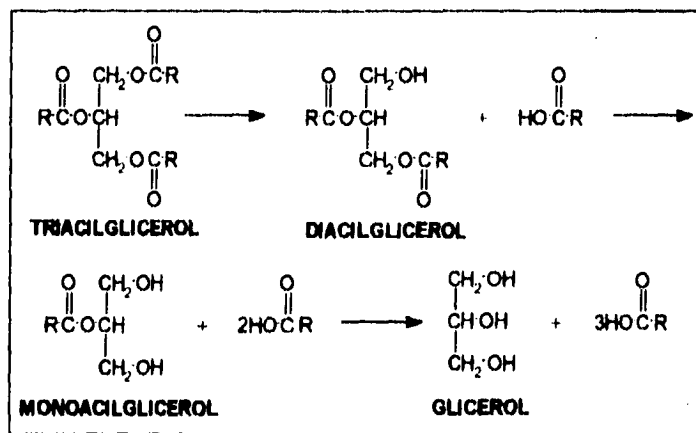


FIGURA 1.- Reacción general catalizada por lipasas.

### 2.1.2. DISTRIBUCIÓN.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza<sup>(4)</sup>, pudiéndose obtener a partir de plantas, animales y microorganismos.

### 2.1.2.1.LIPASAS VEGETALES.

Se han hecho diversos estudios, principalmente en oleaginosas, buscando la presencia de lipasas tanto en plantas completas como en semillas y frutas.

Las semillas germinantes tienen una actividad lipolítica especialmente elevada ya que deben cubrir sus requerimientos energéticos a partir de sus reservas de triacilgliceroles, pero no por ello no hay lipasas presentes en semillas latentes.

Se ha reportado actividad lipolítica en las siguientes semillas: ricino, nabo, colza y girasol<sup>(4)</sup> así como en trigo<sup>(4,8)</sup>, maíz<sup>(8)</sup>, avena <sup>(4,8)</sup> y en frutos de palma<sup>(8)</sup>.

### 2.1.2.2.LIPASAS ANIMALES.

Los estudios que se han realizado sobre lipasas en animales han sido principalmente en mamíferos como cerdo y rata. Éstas se distinguen en tres grupos: 1) lipasas descargadas dentro del tracto digestivo por órganos especializados, 2) lipasas tisulares y 3) lipasas presentes en la leche<sup>(8)</sup>.

Se ha reportado la presencia de lipasas en órganos y tejidos tales como: corazón, cerebro, músculo, arterias, riñón, tejidos adiposos<sup>(8)</sup> y en fluidos como sangre y orina<sup>(4)</sup> y leche. Se presume la presencia de lipasas en peces e invertebrados, principalmente insectos. Baker y Paretsky en 1958<sup>(4)</sup> demostraron la presencia de lipasa en larva de mosca casera.

### 2.1.2.3.LIPASAS MICROBIANAS.

Sobre este tipo de enzimas es en las que han recaído numerosos estudios de desarrollo e investigación por su gran variedad, fácil producción y características. Su

distribución se da ampliamente entre bacterias: *Achromobacter*<sup>(4)</sup>, *Pseudomonas*<sup>(4,34)</sup>; hongos, principalmente de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*<sup>(4)</sup> *Rhizopus* y *Geotrichum*<sup>(34)</sup> y levaduras del género *Candida*.

### 2.1.3.ESPECIFICIDAD DE LIPASAS.

Jensen, Galluzzo y Bush en 1990, proponen una división en esta especificidad de 4 tipos principales<sup>(20)</sup>:

**1) clase de lípido:** la selectividad por la clase de lípido ha sido observada en plasma animal el cual aparentemente contiene lipasas diferentes que muestran preferencia al hidrolizar triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles manifestándose ésto por la velocidad de liberación del producto dependiendo de las sustituciones estéricas que los lípidos posean. Esta hidrólisis dependerá de la cepa de la cual provenga la enzima, así como también de la temperatura<sup>(20)</sup>. Esto es porque se ha observado que algunas lipasas muestran su mayor actividad sobre monoacilgliceroles y actividades más bajas sobre di- y triacilgliceroles.

**2) posicional:** en este tipo podemos encontrar que las lipasas pueden ser no específicas posicionalmente, es decir que hidrolizan los tres enlaces éster de los triacilgliceroles con igual efectividad; o mostrar una de dos clases de especificidad posicional: sn-1,3 específica ó sn-2 específica. El tipo de especificidad sn-1,3 está dado por la liberación preferencial de residuos ácido-grasos de las posiciones terminales del esqueleto del acilglicerol por sobre el átomo de carbono central, mientras que la especificidad sn-2 se refiere a la liberación preferencial del átomo de carbono central. Diversos autores han observado estos tipos de especificidad, siendo extremadamente rara la sn-2, la cual se ha atribuido a la lipasa de *Geotrichum candidum*, por otra parte se ha mencionado que el tipo de especificidad mencionada

arriba no está dividida claramente en estas categorías, sino que cambia desde una alta actividad sn-1,3 específica hasta una muy débil o completamente hasta una actividad no específica<sup>(20)</sup>.

**3) ácido graso:** Se ha observado cierta capacidad de las lipasas para liberar ácidos grasos cuyas longitudes de cadena o grado de insaturación se encuentran dentro de rangos bien definidos; para la misma longitud de cadena del residuo ácido graso la velocidad de ataque parece incrementarse con el número de dobles enlaces que existen en el esqueleto hidrocarbonado<sup>(20)</sup>. Se han realizado numerosos estudios de este tipo de especificidad sobre varios sustratos, observando la facilidad de hidrólisis conforme aumenta o disminuye la cadena hidrocarbonada<sup>(20)</sup>. La distribución de las actividades de las lipasas relativa a varios triacilglicérolos cambia con la temperatura; si la temperatura se incrementa, las velocidades de liberación de ácidos grasos de cadena larga se incrementan más rápidamente que aquellas correspondientes a ácidos grasos de cadena corta<sup>(20)</sup>.

**4) estereoespecificidad:** a pesar de que los primeros estudios no reportan evidencia de ninguna clase de estereoespecificidad para la acción catalítica de lipasas sobre grasas y aceites, hay disponible una gran cantidad de bibliografía relacionada con la preparación de ésteres y alcoholes quirales vía lipasas mediante la resolución de sustratos no triacilglicérolos<sup>(20)</sup>.

#### 2.1.4.USOS.

⇒ Acción hidrolítica.

⇒ Detergentes domésticos.

- ⇒ Destrucción de residuos grasos y oleosos obtenidos durante el procesamiento de alimentos.
- ⇒ Como alternativa a la hidrólisis química en la producción de ácidos grasos<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Combinaciones de lipasas fungales son utilizadas para producir ácidos grasos específicos mediante una hidrólisis selectiva de grasas y aceites<sup>(20)</sup>.
- ⇒ Preparación de ésteres quirales y alcoholes mediante la hidrólisis estereoespecífica de mezclas racémicas.
- ⇒ Conversión de mezclas de isómeros de mentol: ésteres 1-mentil a 1-mentol.
- ⇒ Transformación de triacilgliceroles de bajo valor nutritivo en grasas más valiosas mediante la transesterificación<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Síntesis de ésteres, lactonas y ésteres terpénicos como compuestos saborizantes y aromatizantes<sup>(22)</sup>.
- ⇒ En solventes orgánicos las lipasas pueden catalizar la síntesis de péptidos para la producción de componentes del sabor o sus precursores, sin la desventaja de reacciones hidrolíticas secundarias asociadas al uso de enzimas proteolíticas<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Trans/interesterificación de ácidos grasos en triacilgliceroles para modificar las características de ebullición y por lo tanto mejorar sus propiedades reológicas<sup>(14)</sup>.

- ⇒ Destrucción de residuos grasos y oleosos obtenidos durante el procesamiento de alimentos.
- ⇒ Como alternativa a la hidrólisis química en la producción de ácidos grasos<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Combinaciones de lipasas fungales son utilizadas para producir ácidos grasos específicos mediante una hidrólisis selectiva de grasas y aceites<sup>(20)</sup>.
- ⇒ Preparación de ésteres quirales y alcoholes mediante la hidrólisis estereoespecífica de mezclas racémicas.
- ⇒ Conversión de mezclas de isómeros de mentol: ésteres 1-mentil a 1-mentol.
- ⇒ Transformación de triacilglicérol de bajo valor nutritivo en grasas más valiosas mediante la transesterificación<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Síntesis de ésteres, lactonas y ésteres terpénicos como compuestos saborizantes y aromatizantes<sup>(22)</sup>.
- ⇒ En solventes orgánicos las lipasas pueden catalizar la síntesis de péptidos para la producción de componentes del sabor o sus precursores, sin la desventaja de reacciones hidrolíticas secundarias asociadas al uso de enzimas proteolíticas<sup>(22)</sup>.
- ⇒ Trans/interesterificación de ácidos grasos en triacilglicérol para modificar las características de ebullición y por lo tanto mejorar sus propiedades reológicas<sup>(14)</sup>.

## 2.2 MICROENCAPSULACIÓN

Debido a que la microencapsulación ofrece una inmensa diversidad de preparación de sistemas de atrapamiento, en este capítulo se da una introducción a la microencapsulación.

El surgimiento de la microencapsulación se dio en la década de los años 30's. La microencapsulación se define como una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos y gaseosos en cápsulas selladas de tamaño minúsculo, que pueden liberar su contenido, con velocidades controladas bajo condiciones específicas<sup>(10)</sup>. Los pequeños empaques son de forma idealmente esférica, cuyo tamaño varía desde nanómetros hasta algunos milímetros, sin embargo su forma puede variar de acuerdo a los ingredientes empleados para formarlos. En el encapsulamiento la porción activa es denominada "*corazón*", *fase interna o relleno*, mientras que los materiales encapsulantes son llamados *coraza, cubierta o paredes*; estos últimos determinan la variación tanto en grosor como en número de capas de las cápsulas.

El empleo de la microencapsulación por la industria alimentaria se da por un gran número de razones: estabilizar la fase interna, controlar la liberación de ésta (su inicio y velocidad), así como para separar componentes reactivos e incompatibles en una formulación. La microencapsulación da una opción al procesador de alimentos ya que puede aplicarse como: a) un medio protector de componentes alimenticios para evitar la pérdida nutricional, b) para incorporar mecanismos de liberación por tiempo dentro de la formulación del alimento, c) para enmascarar o preservar sabores y aromas y d) transformar líquidos en ingredientes sólidos fácilmente manipulables<sup>(10)</sup>.

La microencapsulación engloba una diversidad de técnicas para la formación de las microcápsulas. En la Tabla 1 se listan algunos de estos métodos generales y materiales más comunes para realizarlos.

TABLA 1. Técnicas de microencapsulación

MÉTODO	MATERIALES
Secado por aspersión	goma de acacia, maltodextrinas, gelatina, almidones modificados, proteínas
Lecho fluidizado	derivados de celulosa, dextrinas, emulsificantes, lípidos, derivados proteicos y de almidón
Extrusión/encapsulación	carbohidratos: dextrosa, jarabes de maíz, glicerina
Aspersión por congelación	derivados de aceites vegetales, grasas, estearina, mono y diacilgliceroles
Extrusión centrífuga	alginatos
Separación suspensiva rotativa	
Coacervación	gelatina, goma de acacia-gelatina
Inclusión por complejación	ciclodextrinas

Fuente: Dziezak (1988).

Las aplicaciones de la microencapsulación son muy diversas, se ha utilizado en la industria del papel (papel-carbón) usando el método de coacervación; para hacer más fácil el almacenamiento de la gasolina y reducir su riesgo de inflamabilidad para usos militares; para la encapsulación de combustibles para cohetes; en la industria farmacéutica para el empaquetamiento de tabletas, cápsulas, principios activos, hormonas, anticuerpos, vitaminas, etc.; y en la industria alimentaria, principalmente en la industria de sabores para encapsular aceites esenciales<sup>(10)</sup> y en la maduración de quesos<sup>(1,11,12,19,20)</sup>.



### 2.2.1. LIPOSOMAS

La utilización de los liposomas en la Industria Alimentaria, principalmente en el área de productos lácteos para la maduración acelerada de quesos, se ha efectuado exclusivamente para el atrapamiento de enzimas con actividad proteolítica<sup>(11,12)</sup>, no habiendo aún reportes sobre el atrapamiento de lipasas, tal vez debido al hecho de su naturaleza grasa y la actividad que dichas enzimas muestran respecto a substratos de este tipo. A continuación se presenta una descripción del extenso campo de los liposomas.

Los liposomas han sido descritos como arreglos de fosfolípidos y otros lípidos<sup>(16)</sup> que forman vesículas microscópicas multilaminadas o no, consistentes de bicapas concéntricas entre las cuales se encuentran compartimientos acuosos<sup>(23)</sup>, que pueden contener una gran cantidad de compuestos hidrosolubles: drogas, antibióticos, agentes antitumorales, hormonas, virus, enzimas y ADN entre otros (Figura 2), las sustancias liposolubles pueden ser incorporadas dentro de sus bicapas lipídicas<sup>(26)</sup>. Estas vesículas formadas artificialmente con fosfolípidos, son estructuras cerradas que no permiten el paso de sustancias iónicas o polares ni de moléculas grandes en ningún sentido, pero si son permeables al agua<sup>(27)</sup>.

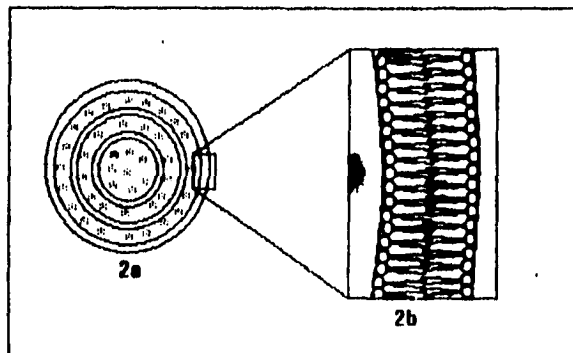


FIGURA 2.- 2a) Representación esquemática de un liposoma multilaminar; 2b) Corte longitudinal de la membrana fosfolipídica.

Los liposomas se pueden clasificar en dos tipos principales de acuerdo a la morfología que presentan al ser preparados<sup>(24,26)</sup>:

Vesículas multilamelares (MLV's): que consisten de varias bicapas fosfolipídicas en forma de esferas concéntricas alternadas con compartimientos acuosos<sup>(16,24,31)</sup>.

Vesículas Unilamelares (ULV's): las cuales sólo presentan una bicapa sencilla que rodea completamente al fluido. Éstas se pueden dividir en:

Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUV's)

Vesículas Unilamelares Largas (LUV's)<sup>(24)</sup>.

Estas últimas se forman a partir de MLV's por sonicación; el que sean SUV's ó LUV's depende del método de preparación utilizado<sup>(26)</sup>.

También han sido observadas por otros autores diversas variedades con otras formas y estructuras, tales como las oligolamelares<sup>(26)</sup>, unilamelares gigantes, multivesiculares, pausilamelares estables, helicoidales y cocleares<sup>(26)</sup>.

De la misma manera que las membranas celulares, las membranas de los liposomas no presentan una barrera al agua pero sí tienen cierta impermeabilidad a la mayoría de los solutos<sup>(24)</sup>. Los liposomas pueden intercambiar los lípidos que los constituyen con las membranas celulares o fusionarse con éstas. Al llevarse a cabo la fusión, las membranas liposomales se integran a las membranas celulares y el contenido acuoso de los liposomas se mezcla con los fluidos de la célula. La capacidad de los liposomas para adsorberse virtualmente a cualquier tipo de célula y entonces liberar su contenido lentamente, hace de ellos excelentes candidatos para constituir sistemas de liberación de compuestos por tiempo. Los liposomas multilamelares (MLV's) son particularmente efectivos para este propósito debido a que el fluido contenido entre cada capa sucesiva

se libera sólo después de que la membrana lipídica alrededor de dicho contenido es degradada<sup>(24)</sup>.

Los liposomas se forman cuando fosfolípidos polares insolubles en agua son confrontados con agua y se lleva a cabo una secuencia de rearreglos por las interacciones de los constituyentes

Las estructuras altamente ordenadas o liposomas que finalmente resultan, persisten aún en presencia de un exceso de agua, lo cual siendo asociado con una entropía desfavorable conduce a otro arreglo de las moléculas lipídicas. Estos fosfolípidos forman esferas cerradas debido a que las moléculas anfipáticas que tienen una cola hidrofóbica se asocian espontáneamente para excluir al agua, mientras que los grupos hidrofílicos se ligan a ésta. El resultado es una bicapa en la cual las cadenas de los ácidos grasos se dirigen hacia el interior de la membrana y las estructuras polares hacia el exterior. En una superficie de la membrana los grupos polares están dirigidos hacia el interior del liposoma y en la superficie opuesta apuntan hacia el ambiente externo. Tan pronto como el liposoma se forma, cualquier molécula hidrosoluble que ha sido añadida al agua es incorporada dentro de los espacios acuosos en el interior de las esferas, mientras que cualquier molécula liposoluble adicionada al solvente durante la formación de las vesículas es incorporada en la estructura de la bicapa lipídica<sup>(24)</sup>.

Se sabe que después de que se efectúa la formación de los liposomas, éstos sufren cambios que los conducen a adquirir un estado más estable. Al inicio de esta transformación, los liposomas presentan una variedad de vesículas regularmente formadas las cuales poseen una geometría bien definida, dando al final delgados filamentos flexibles o pequeñas esferas. Dicha transformación se da secuencialmente de una manera bien definida a través de una de varias rutas.

Las rutas de transformación inician siempre a partir de una forma circular bicóncava, cuyo grosor comienza a decrecer lentamente debido a la evaporación del agua de la superficie lo cual ocasiona que la periferia del liposoma sufra ondulaciones en las que se observa la fluctuación de la membrana. Este fenómeno da como resultado que la circunferencia adopte formas poligonales debido a la formación de vértices y lacos, con lo cual se obtiene una derivación hacia cuatro rutas:

1. Elipse
2. Triángulo
3. Cuadrado
4. Pentágono

Cada forma poligonal continúa una transformación posteriormente, que genera ya sea: formas tubulares ramificadas y formas *cabeza-cola*. Durante la transformación los lados de cada polígono sufren un colapsamiento gradual de tal manera que los vértices llegan a ser puntos y cuando se alcanza una forma crítica es entonces cuando uno o más vértices sufren repentinas protrusiones hacia formas tubulares, es en este momento cuando la vesícula detiene su fluctuación de forma (Figura 3). Lo anterior sugiere que la fuerza que conduce dichas transformaciones es la presión osmótica por diversas observaciones efectuadas<sup>(10)</sup>.

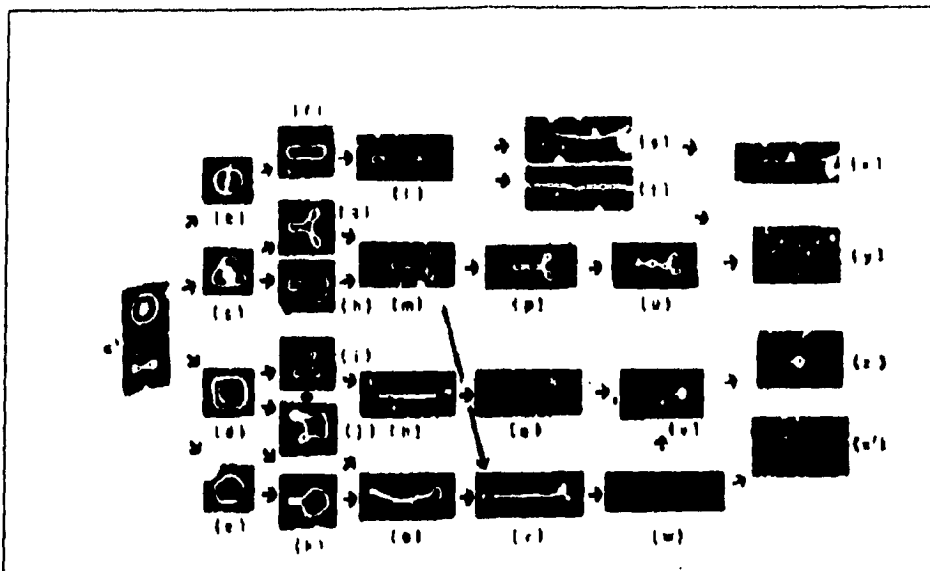


FIGURA 3.- Rutas de transformación de liposomas. Una forma circular bicóncava, de la cual se muestran las vistas frontal y lateral en (a), se transforma a formas más estables en (x), (y), (z) y (z') a través de los posibles rutas mostradas por flechas. El tamaño de cada ilustración es arbitrario. (Tomada de Hotani, 1984).

Los liposomas se pueden formar únicamente con fosfolípidos pero se utilizan también otro tipo de lípidos y compuestos para dar mayor estabilidad y diversas características a estas vesículas. Los fosfolípidos que más comúnmente se utilizan son las lecitinas, ya sea naturales o sintéticas; el uso de unas u otras depende del fin a que los liposomas estén destinados<sup>(16)</sup>, por ejemplo: las lecitinas sintéticas se usan preferentemente en trabajos con pacientes humanos y se prefieren las lecitinas sintéticas con una sola cadena saturada de ácido graso a aquellas que cuentan con dos, ya que esto permite la dispersión de la solución enzimática a temperatura ambiente. También pueden ser utilizados para la formación de liposomas ciertas esfingomielinas y análogos fosfonilos y fosfinilos de las lecitinas así como también fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisolecitinas. Para dar mayor estabilidad a estas cápsulas se combinan los fosfolípidos con otros lípidos: esteroides: colesterol<sup>(16,18)</sup> y

ergosterol<sup>(20)</sup>, cardiolipinas<sup>(21)</sup>, ácidos fosfatídicos, etc. y con otros componentes que pueden ser anfífilos<sup>(16)</sup> o surfactantes<sup>(18)</sup>.

La combinación de estos componentes dependerá de las características deseadas de las vesículas. Se sabe que decrementar la longitud de la cadena acílica e incrementar el grado de insaturación son factores que mejoran la fluidez y promueven la permeabilidad<sup>(6)</sup>.

El descubrimiento original de Bangham es de gran valor para un amplio rango de disciplinas biológicas. Después de algunos años, los liposomas no sólo fueron utilizados como modelo de membranas naturales, sino que también fueron aplicados en laboratorios de todo el mundo para estudiar múltiples fenómenos, incluyendo el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, ya sea como agentes fusogénicos, transportadores de drogas, agentes de diagnóstico, adyuvantes inmunológicos, todo esto aplicado hacia el tratamiento y detección del cáncer, enfermedades infecciosas, artritis reumatoide y para la preparación de vacunas<sup>(26)</sup>. Los liposomas han tenido un amplio uso en la medicina, en dermatología y en la industria cosmética<sup>(21)</sup>.

Se ha sugerido su uso en la Industria Alimentaria para la microencapsulación e inmovilización de enzimas<sup>(11,12,21)</sup>, principalmente en la industria láctea.

Una aplicación de esto es la producción controlada y más rápida, de compuestos saborizantes en queso<sup>(11)</sup>, los cuales también pueden ser utilizados en productos de panadería y cereales, en dulces y confitería, otros productos lácteos, etc.<sup>(6)</sup>, como quesos, cremas, yoghurts y mantequillas<sup>(3)</sup>.

La aplicación de la tecnología de liposomas para la elaboración de productos, ingredientes y aditivos en la Industria Alimentaria es útil por las siguientes razones:

⇒ Los liposomas pueden ser preparados en tamaños similares a las células bacterianas y se espera que éstos se distribuyan en la cuajada de manera similar a estas células.

⇒ Las vesículas fosfolipídicas protegerán también, substratos potenciales en la leche hasta después de que la cuajada haya sido formada y prensada y por lo tanto, pueden evitar los sabores amargos y pérdidas en producto que se dan de la adición directa de una proteasa exógena a la leche<sup>(11,20)</sup>.

⇒ Por lo anterior, los liposomas pueden ser considerados como células bacterianas llenas de mezclas selectas de enzimas que son liberadas gradualmente de manera más rápida<sup>(20)</sup>.

⇒ La tecnología de liposomas ofrece la posibilidad de preparar un amplio espectro de vesículas que varían en tamaño, carga neta, sensibilidad al pH y/o a la temperatura, por lo cual diversas preparaciones pueden aplicarse a diferentes tipos de queso<sup>(11)</sup>.

### **2.3. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA.**

Los sabores encontrados en varios productos lácteos, tales como queso, crema, mantequilla y yoghurt, se caracterizan por los ácidos grasos libres y por los productos de proteólisis limitada<sup>(9)</sup>. Para la producción de estos saborizantes se involucraba la fermentación de leche por varios microorganismos. Debido a que los componentes del substrato eran modificados simultáneamente, el proceso tradicional no permitía enfatizar sobre una nota u otra; además, la reacción avanzaba lentamente y era difícil detenerla y sucedían muchos tipos de modificaciones bioquímicas. La adición de enzimas exógenas a quesos, grasa de mantequilla o leche condensada dio lugar a la

aparición de diversos productos modificados enzimáticamente. Estos productos con sabor intenso pueden emplearse como el único saborizante en un sistema o pueden ser usados en conjunto con otros componentes para lograr el perfil deseado.

Una ventaja con los métodos tradicionales (i.e.: fermentativos) es el tiempo de reacción, ya que en la modificación enzimática éste es mucho más breve. Por ejemplo, para producir sabores añejados el tiempo de reacción varía de 12 a 72 h en contraste con los requerimientos tradicionales de 3 meses a 2 años, además de que la reacción puede ser detenida rápidamente.

La característica más importante de un proceso de modificación enzimática, es el control que se tiene en el desarrollo de los cambios específicos sobre un sustrato. En el proceso de maduración de queso, son modificadas de 1 a 2, notas de sabor más que el perfil completo, ya que este proceso involucra el uso de 1 o 2 enzimas a lo mucho lo cual causa una modificación limitada. En algunos casos los perfiles tradicionales de sabor no son mimetizados exactamente dando como resultado un perfil "desbalanceado" en el producto final, lo cual puede ser deseable, especialmente en aderezos elaborados con queso. Existe la posibilidad de que en los procesos tradicionales un microorganismo afecte un número de compuestos y produzca efectos sensoriales que no pueden ser obtenidos con el uso exclusivo de la enzima. Lo anterior conduce a diferencias cualitativas, las cuales pueden ser minimizadas mezclando una pequeña cantidad del queso añejado tradicionalmente con el sistema modificado enzimáticamente. En la práctica industrial se ha definido el término **QME** (Queso Modificado Enzimáticamente) como aquel queso concentrado en sabor que se obtiene a partir de la interacción de quesos frescos y preparaciones enzimáticas<sup>(33)</sup>. Dicho proceso genera compuestos saborizantes, cuyo desarrollo en el queso normalmente requiere meses para conferir un sabor que es característico de quesos añejados<sup>(33)</sup>.



Estos QME están diseñados específicamente para proveer una fuente concentrada de sabores a queso o con notas lácteas.

## 3. objetivos

### **3.1. OBJETIVO GENERAL.**

Generar un sistema de atrapamiento para una enzima lipolítica por medio de la técnica de formación de liposomas.

#### **3.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.**

Encontrar la combinación de ingredientes necesarios en una formulación para obtener liposomas que repercuta:

- a) en mayor actividad lipolítica en función de la concentración de enzima y,
- b) en mayor estabilidad.

## 4. estrategia

La estrategia planteada para lograr estos objetivos fue la siguiente:

1. Se utilizó la lipasa de *Candida cylindracea* como modelo debido a que ésta es ampliamente conocida, está caracterizada y se dispone de preparaciones comerciales.
2. Antes de proceder a trabajar con esta enzima se determinó la actividad óptima de ésta, utilizando el método propuesto por Espinosa<sup>(19)</sup>, el cual se basa en medir la variación de pH que la actividad de la enzima ocasiona en el medio de reacción al actuar sobre un substrato conocido. Se utilizó este método debido a su rapidez y sencillez.
3. Para la preparación de liposomas se siguió el procedimiento descrito por Gregoriadis<sup>(16)</sup>. Se utilizaron los mismos componentes variando las proporciones de éstos con lo que se obtuvieron seis formulaciones distintas que fueron utilizadas para atrapar tres concentraciones de la enzima de *Candida cylindracea*. Lo anterior estuvo basado en un modelo factorial 6 X 3.
4. La determinación de la proteína atrapada en los liposomas se efectuó utilizando una modificación de la técnica de Lowry propuesta por Peterson<sup>(20)</sup>. Las muestras para esta determinación se prepararon como lo describe el método de McWilliam y Stewart<sup>(21)</sup>.
5. Se realizaron tres evaluaciones de la actividad de la enzima atrapada en los liposomas recién preparados y a intervalos de 72 y 144 h, sobre el mismo substrato y condiciones determinadas en el punto 2. El tiempo total de cada evaluación fue de dos horas tomando alícuotas cada 24 min.

6. Para la cuantificación de la actividad lipolítica de los liposomas se utilizó el método de cromatografía de gases propuesto por Deeth y Fitzgerald<sup>(7)</sup>. No se utilizó el método de Espinosa<sup>(13)</sup> debido a la gran cantidad de tiempo necesario para evaluar cada unidad experimental.
  
7. La selección del mejor sistema obtenido se realizó por análisis estadístico del modelo factorial 6 X 3 para cada alícuota tomada durante las evaluaciones de la actividad de los liposomas.

---

## 5. material y métodos

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE *CANDIDA CYLINDRACEA***

La determinación de la actividad de la lipasa de *Candida cylindracea*, se realizó con el método descrito por Espinosa<sup>(13)</sup>. El pH se midió con un potenciómetro ORION Modelo 520A, colocando su electrodo en un tubo de vidrio dentro de un baño de agua con temperatura controlada y utilizando un agitador magnético.

Se preparó una mezcla de solución de tributirina (1,2,3-tributirilglicerol) 99% pureza (SIGMA Chemical Co., San Luis) al 5% (v/v) en agua destilada con 0.01% de Tween 80 (Polioxietil-2-sorbitan-mono-oleato) (CANAMEX S.A. DE C.V., México). También se preparó un *buffer* de fosfatos 0.02 M, pH= 9.40.

Se colocaron dentro del tubo 7 mL de solución amortiguadora, 2 mL de tributirina homogeneizada y 1 mL de solución enzimática [15 mg/mL]. Se registró el pH en el punto inicial (t=0) y en intervalos de 15 s durante 6 min. El pH en el cual se registra una mayor actividad de la enzima se obtuvo de una gráfica de  $\Delta\mu\text{mol ácido butírico liberado}/\Delta t$  vs pH.

## **PRODUCCIÓN DE LIPOSOMAS.**

La preparación de liposomas se hizo utilizando el método descrito por Gregoriadis<sup>(14)</sup>. Se prepararon seis distintas formulaciones tomando como base 20  $\mu\text{moles}$  de lecitina (7 proporciones) y variando las concentraciones de colesterol: 5.7 y 11.4  $\mu\text{mol}$  (2 y 4 proporciones) así como también las de dicetilfosfato: 0, 2.85 y 5.7  $\mu$



mol (0, 1 y 2 proporciones) para cada mL de liposomas. Tomando las proporciones de componentes como codificadores para las formulaciones nos referiremos a ellas como: 720, 721, 722, 740, 741 y 742. Se utilizó una enzima comercial de *Candida cylindracea* para ser atrapada ya que es de fácil adquisición y sus condiciones de trabajo son conocidas.

Se prepararon tres soluciones de enzima lipolítica de *Candida cylindracea* [1, 5 y 10 mg/mL] en un *buffer* de fosfatos 7.5 mM, pH = 7.10 previamente elaborado.

200  $\mu$ moles de lecitina (L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina) (SIGMA Chemical Co., San Luis), 57 y 114  $\mu$ moles de colesterol (5-colesten-3 $\beta$ -ol) (SIGMA Chemical Co., San Luis) y 0, 28.5 y 57  $\mu$ moles de dicetilfosfato (dihexadecilfosfato) (SIGMA Chemical Co., San Luis) se disolvieron en 30 mL de cloroformo dentro de un matraz de bola aforado de 50 mL. El solvente se removió en un rotavapor durante 15 min bajo presión reducida y  $37 \pm 1$  °C hasta que se observó una capa fina y uniforme adherida a las paredes del matraz. El matraz fue removido del evaporador y se purgó con nitrógeno; se agregaron 10 mL de solución enzimática y se utilizaron perlas de vidrio para facilitar la incorporación de los lípidos a la solución. La suspensión lechosa formada se almacenó a 4 °C durante 1 h en una atmósfera de nitrógeno.

Después de transcurrido este tiempo se efectuó la separación de los liposomas de la enzima libre utilizando una ultracentrifuga BECKMAN L7-65; para ello se agregaron 30 mL de *buffer* de fosfatos 75 mM, pH = 7.10 y se centrifugó a 50 000 rpm en un rotor 60 Ti durante 30 min a una temperatura de 4 °C. Lo anterior se hizo una vez más, utilizando esta vez 40 mL de *buffer*. El paquete de liposomas obtenido se resuspendió con 10 mL del mismo *buffer* + 0.85% de cloruro de sodio. La preparación de liposomas se efectuó por duplicado.

La secuencia de la metodología se puede observar en la Figura 4.

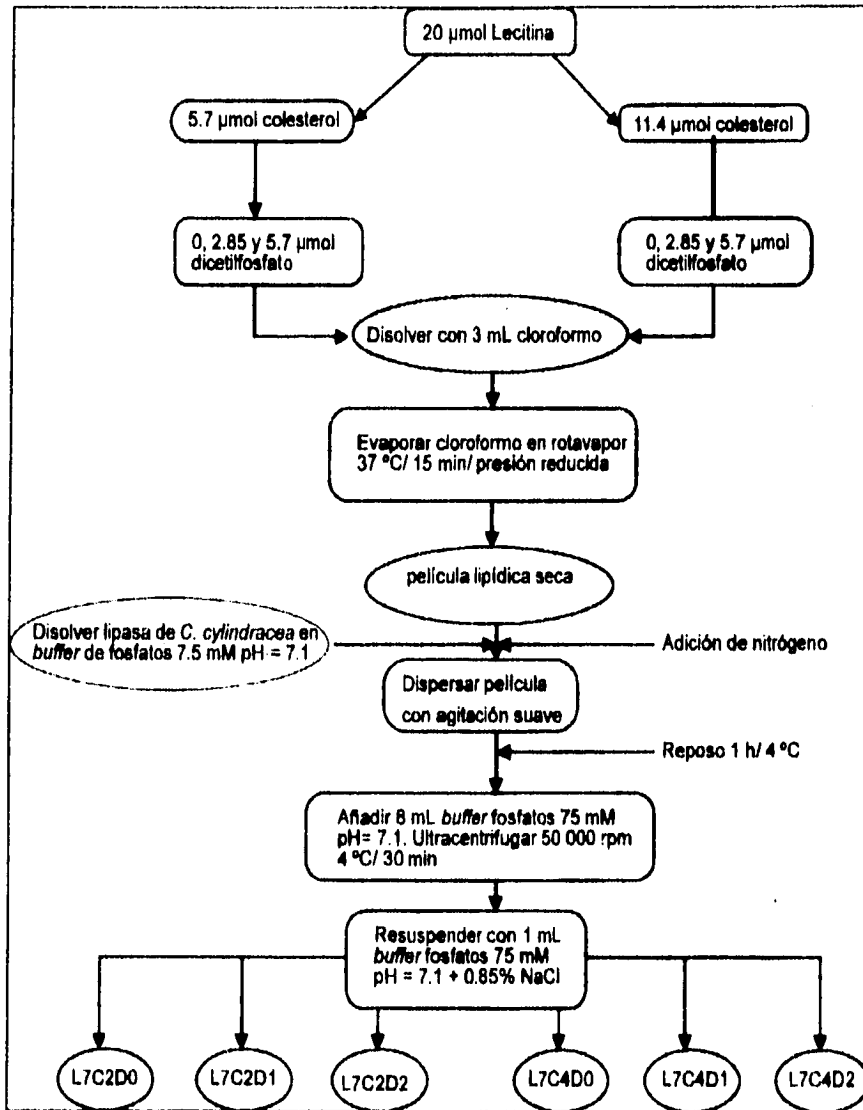


Figura 4.- Diagrama de flujo de la preparación de liposomas multilamelares..

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

La medición de proteína en los liposomas así como en los sobrenadantes obtenidos del lavado de los liposomas se basó en el método propuesto por Peterson<sup>(22)</sup>.

Se prepararon 4 soluciones : 1) CTC: [sulfato cúprico monohidratado al 0.1% (p/v), tartrato doble de sodio y potasio 0.2% (p/v) y carbonato de sodio 10% (p/v)]; 2) SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 10% (p/v); 3) Hidróxido de sodio 0.8 N y 4) Reactivo de Folin-Ciocalteu en agua destilada (1:5). Con las primeras tres soluciones se preparó un reactivo denominado A [ 1 parte de CTC con 2 partes de SDS y 1 parte de NaOH ].

Se preparó una solución estándar de lipasa de *Candida cylindracea* tipo X-E (SIGMA Chemical Co., San Luis) [ 50 µg/mL ], con la cual se hizo una curva patrón con concentraciones entre 0 y 50 µg de enzima a intervalos de 5 µg. Se utilizó como blanco el tubo correspondiente a 0 µg.

**Preparación de muestras:** esta técnica se tomó del método descrito por Mc-William y Stewart<sup>(23)</sup>. Una muestra de cada formulación de liposomas se disolvió en metanol absoluto (en una proporción de 1 parte de liposomas y 9 partes de solvente) y se dejó reposar a  $-20 \pm 1$  °C durante 24 h. La proteína precipitada se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf 5415C a 14 000 rpm, durante 30 min. El sobrenadante se eliminó y el metanol residual fue removido utilizando vacío. La proteína seca se disolvió y aforó a un volumen de 1 mL de agua destilada. El contenido proteico de los sobrenadantes resultantes del lavado de los liposomas fue tratado de igual manera.

Alícuotas de las muestras ya preparadas conteniendo entre 0 y 50 µg fueron aforadas a 1 mL con agua destilada, después de lo cual se les adicionó 1 mL de reactivo A, se agitaron y dejaron reposar 10 min. Se les adicionó 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu preparado, agitando inmediatamente en un vortex; se dejaron reposar

30 min y después se leyeron en un espectrofotómetro Spectronic 21D a una longitud de onda de 590 nm. Los valores de proteína se obtuvieron interpolando en la curva de calibración realizada previamente. Los resultados se reportaron como % de proteína atrapada dentro de los liposomas. En todos los casos las determinaciones se hicieron por duplicado.

### **ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LOS LIPOSOMAS.**

La reacción de actividad lipolítica se efectuó con el mismo substrato utilizado para la medición de la actividad con la enzima libre. Se hicieron tres evaluaciones de la actividad lipolítica para cada formulación con intervalos de 72 h. cada una, denominadas 1ª, 2ª y 3ª evaluación de actividad tomándose alícuotas del medio de reacción de 1 mL a intervalos de 24 min hasta completar 2 h. Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 75 mM, pH = 7.10 como medio de reacción.

En matraces Erlenmeyer de 50 mL con tapón de rosca se colocaron 2 mL de tributirina homogeneizada y 7 mL de *buffer*, después se adicionó 1 mL de cada una de las formulaciones de liposomas preparados; los matraces fueron colocados dentro de un baño de agua con temperatura (37 °C) y agitación (150 rpm) controladas.

Alícuotas de 1 mL del sistema de reacción se colocaron en tubos eppendorf e inmediatamente se sometieron a calentamiento (100±1 °C) en un baño seco durante 12 min. Dichas alícuotas fueron tomadas cada 24 min durante un lapso de 2 h.

Para la segunda y tercera evaluación de la actividad lipolítica, la alícuotas de 1 mL de liposomas fueron ultracentrifugadas en las condiciones descritas anteriormente,

antes de ser añadidas al sistema de reacción; los sobrenadantes resultantes de la ultracentrifugación se utilizaron en la cuantificación de proteína.

## **MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

Para cuantificar la cantidad de ácido butírico liberado se utilizó el método de cromatografía de gases propuesto por Deeth, Fitz-Gerald y Snow<sup>(7)</sup>, para lo cual se prepararon soluciones de ácido butírico a concentraciones de 0.1, 0.05, 0.02, 0.015, 0.01 y 0.005 M, en éter di-isopropílico más 4% de ácido fórmico.

Para elaborar la curva de calibración se inyectaron alícuotas de 3  $\mu$ L, de cada una de las soluciones anteriores, en un cromatógrafo VARIAN 3600 (VARIAN Walnut Creek, USA), equipado con un detector de ionización de flama (FID). Las condiciones fueron: Columna SP-216-PS en 100/200 Supelcoport con una temperatura de 100 °C y una atenuación de 1. La temperatura del detector fue de 200 °C y la del inyector de 230 °C. Se determinó la ecuación de regresión lineal de las respuestas en área en función de la concentración de ácido butírico.

### **PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Se prepararon tres soluciones: a) Hexano-éter dietílico 1:1 (v/v) y b) ácido sulfúrico 5 N y c) éter di-isopropílico más 4% de ácido fórmico. Se inactivó alúmina neutra (Hidróxido de aluminio) con 4% de agua destilada al menos 2 h antes de ser utilizada.

A cada mL de muestra obtenida de la Actividad Lipolítica de Liposomas le fueron añadidos 5 mL de solución hexano-éter 1:1 y 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 5 N. La muestra se deshidrató adicionando sulfato de sodio anhidro hasta saturación.

#### CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO BUTÍRICO.

El volumen total de la solución hexano-éter obtenida arriba se añadió cuidadosamente a una pequeña columna de cromatografía que contenía 1 g de alúmina neutra desactivada. La solución se pasó a través de la columna con un flujo de 0.5 mL/min. El eluato fue descartado. La alúmina con el ácido butírico adsorbido se secó con vacío aplicado a la salida de la columna y posteriormente se transfirió a un frasco vial de 5 mL con contratapa y tapón de rosca. 1 mL de éter di-isopropílico conteniendo 4% de ácido fórmico se añadió a cada vial y se mezcló cuidadosamente con la alúmina.

Se inyectó, por duplicado en el cromatógrafo de gases, una alícuota de 3  $\mu$ L de cada muestra preparada. Los resultados se expresan en  $\mu$ mol de ácido butírico liberado/mL/min y fueron analizados por medio de análisis de varianza.

---

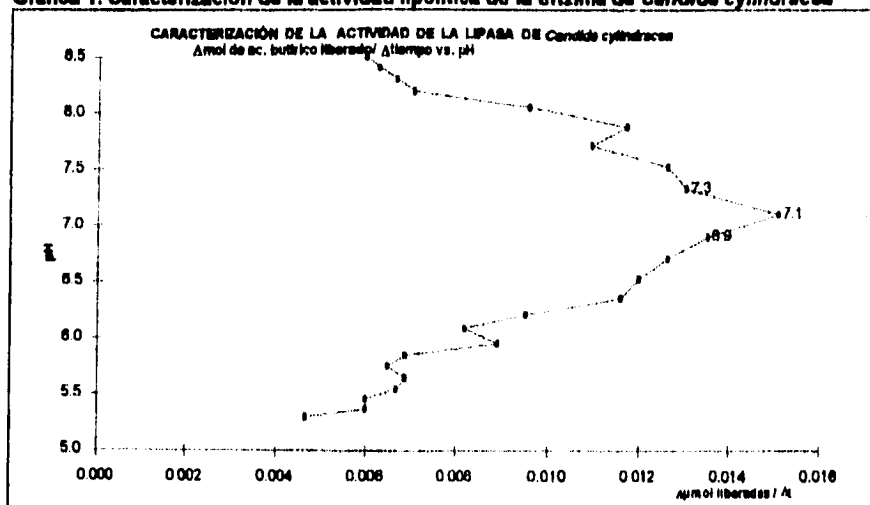
## **6. resultados y** **discusión**

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE *CANDIDA CYLINDRACEA*

La lipasa de *Candida cylindracea* ha sido ampliamente utilizada en diversas áreas, por lo que resulta un buen modelo de estudio. En la primera etapa del presente trabajo se realizó la cuantificación de proteína y actividad lipolítica de la preparación comercial empleada para ajustarse a la metodología disponible en el laboratorio, consistente en determinar actividad lipolítica por caída de pH<sup>(13)</sup>. La ventaja de utilizar la técnica empleada es la rapidez de análisis y el bajo costo que ésta representa. El método utilizado para esta determinación cuantifica la variación de pH, la cual es generada por los productos (AGL). En este caso el producto fue ácido butírico ya que el sistema de reacción es sobre tributirina.

El pH óptimo se determinó como aquél en el que se lleva a cabo la mayor liberación de ácido butírico en un tiempo determinado, punto que está dado por un máximo en la Gráfica 1. El primer aspecto a considerar para implementar esta metodología es trabajar en el pH óptimo de la enzima. Esto presenta la dificultad de que este parámetro varía durante el curso de la reacción. Por lo tanto se iniciaron las mediciones a pH 9.46 a intervalos de 15 segundos hasta completar 360 s. Este tiempo se fijó como máximo puesto que en otro experimento (datos no mostrados) se observó el agotamiento del sustrato en este lapso. La gráfica obtenida se realizó con los puntos resultantes del cociente de la variación de  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberado y la variación del tiempo contra el pH ( $\Delta\mu\text{mol ac. butírico liberado}/\Delta t$  vs pH)(Gráfica 1).



Gráfica 1. Caracterización de la actividad lipolítica de la enzima de *Candida cylindracea*

El pH al cual se obtuvo la mayor actividad lipolítica de la enzima de *Candida cylindracea* fue de 7.10 (Gráfica 1), lo cual concuerda con las especificaciones dadas por el proveedor (SIGMA Chemical Co., San Luis, USA). Este pH determinado se utilizó para establecer las condiciones de trabajo a pH constante sobre el sustrato elegido, para que una vez que la enzima estuviera atrapada se observara la mayor liberación de ácido butírico durante el mayor tiempo posible, y no hubiera una inhibición parcial de la enzima debido a la disminución del pH del sistema de reacción.

## PRODUCCIÓN DE LIPOSOMAS.

Las posibilidades de variación para la formación de liposomas incluían alterar el tipo y las proporciones de los componentes. Se optó por mantener constante el tipo de los mismos y trabajar con tres ingredientes, con base a la siguiente argumentación:

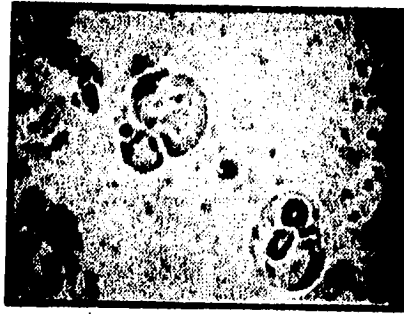
1. Selección del fosfolípido principal: Se utilizó la lecitina principalmente por su naturaleza debido a la resistencia que ésta da a las membranas, ya que, a diferencia de la fosfatidiletanolamina, al tener una carga positiva y una carga negativa en la porción polar se originan fuerzas de atracción entre las cabezas de los fosfolípidos con cargas opuestas<sup>(27)</sup>; además de que es un fosfolípido que tiene la mayor disponibilidad comercial e incluso puede ser obtenido fácilmente de fuentes naturales.

2. El colesterol fue utilizado ya que diversas fuentes<sup>(8,22,21)</sup> reportan que este esteroide proporciona estabilidad a las membranas; y el dicetilfosfato se seleccionó por su carácter negativo el cual es el apropiado debido a la carga de la enzima<sup>(18)</sup>.

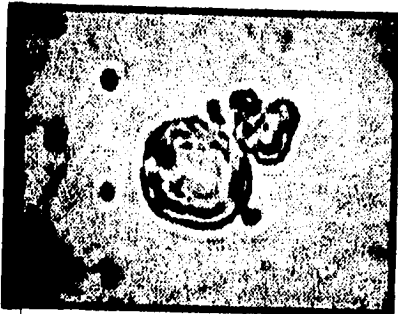
Se decidió obtener únicamente liposomas macrovesiculares ya que éstos por su gran tamaño (5-50  $\mu\text{m}$ ), pueden ser observados fácilmente utilizando un microscopio óptico, a través del cual se obtuvieron algunas fotografías (Figura 5).



FOTOGRAFÍA (1): Fórmula: 720  
Aumento: 100X



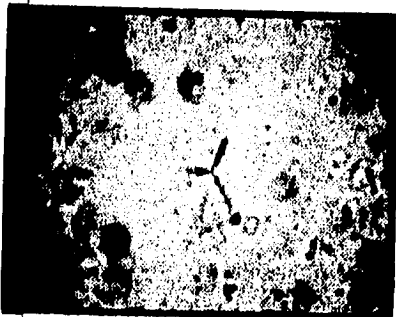
FOTOGRAFÍA (2): Fórmula: 721  
Aumento: 100X



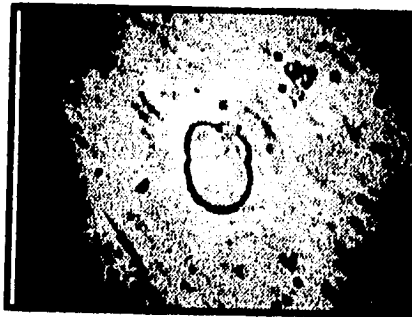
FOTOGRAFÍA (3): Fórmula: 740  
Aumento: 100X



FOTOGRAFÍA (4): Fórmula: 740  
Aumento: 100X



FOTOGRAFÍA (6): Fórmula: 741  
Aumento: 100X



FOTOGRAFÍA (8): Fórmula: 741  
Aumento: 40X

FIGURA 5. Fotografías de liposomas obtenidos. (tomadas con una cámara de 35 mm Contax 167 MT (Carl Zeiss, Germany) montada sobre un microscopio óptico (Carl Zeiss, Germany).

Las fotografías de la Figura 5 permiten observar la morfología de las estructuras formadas. No se encuentra una forma definida atribuible a los cambios en ingredientes en los liposomas obtenidos. En algunas fotografías se puede apreciar la compartimentalización que caracteriza a los liposomas multilamelares. Las estructuras que se aprecian en las fotografías no muestran esferas perfectas, pero sí dejan ver cierta concetricidad entre compartimentos. En la fotografía (5) se observa un liposoma de forma "Y", la cual es un estadio de la ruta de transformación triangular, junto con liposomas que ya han alcanzado su transformación completa, ya sea a través de esta misma ruta o por desviación hacia la ruta de pentágono a partir de esta forma "Y". La fotografía (4) muestra a una forma que antecede a la forma "Y" en la ruta triangular<sup>(46)</sup>.

### **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA ATRAPADA.**

Cuando se monta un sistema de atrapamiento o inmovilización de enzima es importante establecer la eficiencia del proceso. Uno de los criterios empleados es el porcentaje de proteína total atrapada. En el caso de liposomas la presencia de lípidos provoca interferencia al emplear las técnicas de cuantificación tradicionales, como Lowry y Bradford. Por ello la técnica utilizada para la medición de proteína, es un método propuesto por Peterson<sup>(20)</sup>, el cual es una modificación del método descrito por Lowry. Se utilizó esta técnica ya que es un método rápido y muy sensible que puede medir fácilmente las cantidades de enzima con las que se trabajó. La curva patrón (Apéndice A) utilizada para obtener los valores de proteína en las muestras se elaboró con la misma enzima de *Candida cylindracea* para no tener errores en la cuantificación, tomando en cuenta que ésta contenía 30% de lactosa como extendedor. Las muestras,

antes de ser sometidas a la técnica propuesta por Peterson, se trataron de la manera descrita por McWilliam y Stewart<sup>(23)</sup> con el fin de eliminar la interferencia causada por las altas concentraciones de lípidos presentes en las muestras. Esta técnica se basa en la extracción de los lípidos con metanol absoluto.

La curva patrón (Apéndice A) elaborada para la interpolación de los valores de absorbancia de las muestras mostró un comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación de 0.99364.

Utilizando esta curva se procedió a evaluar el porcentaje de atrapamiento de enzima de *Candida cylindracea* en los liposomas formados. La Tabla 2 muestra el porcentaje de enzima retenido en el interior de los liposomas inmediatamente después de que éstos fueron obtenidos.

Tabla 2. Porcentaje de lipasa de *Candida cylindracea* retenida dentro de liposomas multilamelares recién formados para cada concentración de enzima utilizada.

FORMULACIÓN				[ENZIMA] (mg/mL)		
				1	5	10
	LECITINA ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COLESTEROL ( $\mu\text{mol/mL}$ )	DICETILFOSFATO ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ENZIMA ATRAPADA %		
<b>720</b>	20	5.7	0	30.51	23.71	12.11
<b>721</b>	20	5.7	2.85	23.90	21.45	18.33
<b>722</b>	20	5.7	5.7	23.01	20.00	23.20
<b>740</b>	20	11.4	0	33.49	31.26	17.44
<b>741</b>	20	11.4	2.85	23.55	23.81	17.14
<b>742</b>	20	11.4	5.7	41.24	26.99	25.57

En esta tabla se aprecia que el porcentaje de atrapamiento por todas las formulaciones de liposomas fue mayor para la solución enzimática de concentración 1 mg/mL decreciendo, dicho porcentaje, conforme se aumentó la concentración de la solución enzimática utilizada. La Tabla 2 muestra que la formulación correspondiente a

20  $\mu\text{mol}$  de lecitina, 11.4  $\mu\text{mol}$  de colesterol y 5.7  $\mu\text{mol}$  de dicetilfosfato, es decir, la formulación con el máximo contenido de componentes por mL, es la que retiene mayor cantidad de enzima en todos los casos. Se aprecia que cuando se duplica la proporción de colesterol en las formulaciones se mejora el atrapamiento de enzima en el interior de los liposomas para las tres soluciones enzimáticas; dicho comportamiento no se cumple entre la formulación 721 y la formulación 741 ya que existe una ligera disminución del porcentaje de enzima atrapada cuando se duplica la concentración de colesterol. El adicionar dicetilfosfato no muestra un comportamiento definido en el atrapamiento de la enzima cuando los liposomas están recién formados.

La determinación de enzima atrapada en los liposomas a las 72 h de su formación no mostró variación alguna comparada con la determinación realizada a las 144 h. En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de enzima cuantificado en el interior de los liposomas a las 144 h. de su formación.

Tabla 3. Porcentaje de lipasa de *Candida cylindracea* retenida en el interior de liposomas multilamelares 144 h después de su formación, para cada concentración de enzima utilizada.

	FORMULACIÓN			[ENZIMA] (mg/mL)		
	LECITINA ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COLESTEROL ( $\mu\text{mol/mL}$ )	DICETILFOSFATO ( $\mu\text{mol/mL}$ )	1	5	10
				ENZIMA ATRAPADA %		
<b>720</b>	20	5.7	0	19.86	21.60	12.11
<b>721</b>	20	5.7	2.85	23.90	21.45	16.86
<b>722</b>	20	5.7	5.7	23.01	20.00	14.90
<b>740</b>	20	11.4	0	17.69	21.88	11.83
<b>741</b>	20	11.4	2.85	19.03	23.81	15.43
<b>742</b>	20	11.4	5.7	23.03	25.67	24.49

En la determinación de enzima atrapada para este tiempo (144 h) sigue siendo la formulación 742 la que muestra la mayor efectividad para atrapar a la enzima de *Candida cylindracea*. La Tabla 3 nos permite ver que las formulaciones que contienen

dos proporciones de colesterol (11.4  $\mu\text{mol}$ ), el dicetilfosfato proporciona a los liposomas mayor capacidad de atrapamiento de esta enzima, esto es por comparación con la formulación que carece de este anfífilo (740), ya que se observan los mayores valores para las formulaciones 741 y 742. Este efecto se da debido a que el dicetilfosfato es un lípido cargado negativamente, que al incluirse en las membranas formadas crea un efecto electrostático de repulsión entre las superficies de las membranas cargadas favoreciendo la permanencia de la fase acuosa que se encuentra entre ellas.

El grupo de formulaciones que únicamente contienen una proporción de colesterol (5.7  $\mu\text{mol}$ ), no presenta este comportamiento. Incluso en la formulación que contiene dos proporciones de dicetilfosfato (722) se presentan valores de retención inferiores a los de la formulación que tiene una proporción de dicetilfosfato (721). Esto puede deberse a que al agregar cantidades equimolares de los dos componentes, la cantidad de cargas en la superficie de las membranas sea menor y por ello también lo sea el efecto neto de repulsión que se espera se de entre dichas membranas, aunque no por ello es menor que el de la formulación que carece del anfífilo (720).

La Tabla 4 muestra en porcentaje, la cantidad de enzima que se perdió del interior de los liposomas después de 144 h de que éstos fueron preparados.

Tabla 4. Porcentaje de lipasa de *Candida cylindracea* perdida del interior de los liposomas multilamelares a las 144 h después de formados, para cada concentración de enzima utilizada.

	FORMULACIÓN			[ENZIMA] (mg/mL)		
				1	5	10
	LECITINA ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COLESTEROL ( $\mu\text{mol/mL}$ )	DICETILFOSFATO ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ENZIMA ATRAPADA %		
720	20	5.7	0	34.92	8.88	0.00
721	20	5.7	2.85	0.00	0.00	8.03
722	20	5.7	5.7	0.00	0.00	35.76
740	20	11.4	0	47.19	30.02	32.17
741	20	11.4	2.85	36.18	0.00	9.95
742	20	11.4	5.7	44.15	4.89	4.21

De esta tabla puede apreciarse que es para la solución enzimática con 5 mg/mL donde se observa la mayor estabilidad para los liposomas, esto ocurrió principalmente en los liposomas que contenían dicetilfosfato en su formulación. Lo anterior hace notar que para dar estabilidad a los liposomas, es importante que éstos contengan una cierta cantidad de enzima de *Candida cylindracea* y dicetilfosfato para mantener las repulsiones y atracciones electrostáticas en un equilibrio estable de manera que se conserve por más tiempo la estructura de los liposomas. Cuando se trabajó con una menor cantidad de la enzima (1 mg/mL), solamente los liposomas con dos proporciones de colesterol (11.4  $\mu\text{mol}$ ) y ya sea 1 o 2 proporciones de dicetilfosfato (2.85 y 5.7  $\mu\text{mol}$ ) mantuvieron una alta estabilidad (no hubo pérdida de enzima), observándose que al aumentar la concentración de colesterol para esta solución enzimática se da una gran pérdida de enzima del interior de los liposomas, lo que hace pensar en una alteración del equilibrio de cargas presentes -las cargas proporcionadas por la enzima no son suficientes para estabilizar las cargas debidas al dicetilfosfato- que hace menos estable la estructura liposomal. Al trabajar con una cantidad mucho mayor de enzima (10 mg/mL) dicho equilibrio electrostático se ve ahora alterado por la propia enzima y las concentraciones de colesterol y dicetilfosfato utilizadas no son suficientes para



mantener el liposoma estable, amén que también el acomodo de la proteína en la membrana le da menos resistencia.

## ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LOS LIPOSOMAS

El factor más importante a analizar es la actividad lipolítica que presentan las estructuras de liposomas formados. Se presumía que ésta podía ser afectada por los componentes de la fórmula, la concentración de enzima empleada, el tiempo de almacenamiento de los liposomas y, finalmente el tiempo de reacción.

El estudio de las posibles interacciones se realizó mediante un diseño factorial 6 X 3 para cada tiempo (24 min) a lo largo de cada evaluación de actividad considerando los siguientes factores: Enzima y Fórmula. Éste último engloba tanto Colesterol como el Dicitilfosfato con lo cual quedan establecidas las seis formulaciones con las que se trabajó: L7C2D0, L7C2D1, L7C2D2, L7C4D0, L7C4D1 y L7C4D2(Tabla 5).

Tabla 5. Diseño factorial 6 X 3 para evaluaciones de actividad lipolítica

F	[ENZIMA] (mg/mL)		
	1	5	10
Ó	L7C2D0	L7C2D0	L7C2D0
R	L7C2D1	L7C2D1	L7C2D1
M	L7C2D2	L7C2D2	L7C2D2
U	L7C4D0	L7C4D0	L7C4D0
L	L7C4D1	L7C4D1	L7C4D1
A	L7C4D2	L7C4D2	L7C4D2

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de actividad lipolítica a lo largo del tiempo de reacción para todas las formulaciones de liposomas

obtenidos así como para cada concentración de enzima utilizada. Estos resultados son únicamente de la tercera evaluación (144 h) debido a que

**TABLA 6. Determinación de actividad lipolítica por formulación para cada tiempo de reacción y concentración de enzima utilizada, en la tercera evaluación (144 h).**

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN					
		720	721	722	740	741	742
24	1	5.06	7.59	7.59	4.53	7.97	11.56
	5	3.28	9.00	11.55	6.45	5.22	13.50
	10	11.56	9.41	7.64	11.61	14.28	9.81
48	1	7.00	9.14	9.74	6.72	14.54	15.40
	5	4.88	11.01	15.09	10.28	12.00	19.04
	10	15.00	6.03	11.99	14.93	9.61	12.40
72	1	8.06	11.86	12.87	8.10	16.61	17.53
	5	5.58	14.64	17.00	11.52	15.32	26.41
	10	20.47	10.24	15.17	15.83	17.65	21.97
96	1	7.29	11.63	11.01	9.16	22.52	23.08
	5	11.68	13.30	24.78	10.75	19.13	30.77
	10	19.24	8.52	17.17	16.24	18.88	17.58
120	1	9.06	17.17	12.65	10.18	26.08	22.34
	5	9.51	11.04	28.61	10.80	16.03	29.57
	10	17.66	12.02	15.31	18.03	27.07	17.66

Los valores de actividad están reportados en  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberados.

se analizaron los datos correspondientes a las actividades de 0 h, 72 h (datos no mostrados) y 144 h encontrándose solamente interacción altamente significativa para la evaluación a 144 h. Se utilizó el análisis de varianza como herramienta de análisis, los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 7.

**TABLA 7. Resumen de los Análisis de Varianza efectuados para la evaluación a las 144 h para los diferentes tiempos de reacción. Incluye los factores Enzima, Formulación y la interacción entre éstos.**

ACTIVIDAD (h)	TIEMPO (min)	ENZIMA (g.l.)	FORMULACIÓN (g.l.)	$F_0$ Enz-Form.	CME
144	24	2	5	127.97**	0.1413
144	48	2	5	218.57**	0.1313
144	72	2	5	163.98**	0.1948
144	96	2	5	332.81**	0.1505
144	120	2	5	478.65**	0.1628

\*\* : Diferencia altamente significativa. g.l.: grados de libertad para cada factor.

Aunado a lo anterior, es importante ver las comparaciones múltiples para este análisis y de esta manera poder definir en cuál combinación se da esta diferencia en mayor grado. Esto permite conocer si existe diferencia significativa entre las otras formulaciones utilizadas. Para verificar la posible similitud entre las combinaciones de efectos, se hicieron comparaciones múltiples por el método de Duncan al 5%. Se revisó para cada concentración de enzima, variando las formulaciones bajo cada condición experimental, es decir para cada tiempo en el cual se tomó muestra. Las comparaciones señalan la posible similitud estadística entre las medias correspondientes de los efectos combinados. En esta prueba se verificaron, para cada nivel fijo del factor enzima, las siguientes hipótesis:

1)  $H_0$ : El efecto de actividad lipolítica observado para las distintas formulaciones a un nivel fijo de enzima, es el mismo.

vs.

$H_a$ : Al menos una de las formulaciones presenta un mayor efecto de actividad lipolítica.

Para estas comparaciones se utilizaron los valores críticos de intervalo mínimo significativo (R) con un  $\alpha = 0.05$

$$R_2 = r_{2,18} \cdot S_y = 2.97 S_y$$

$$R_3 = r_{3,18} \cdot S_y = 3.12 S_y$$

$$R_4 = r_{4,18} \cdot S_y = 3.21 S_y$$

$$R_5 = r_{5,18} \cdot S_y = 3.27 S_y$$

$$R_6 = r_{6,18} \cdot S_y = 3.32 S_y$$

Donde la  $S_y^2 = \frac{CME}{n}$  correspondiente a cada uno de los análisis de varianza que se realizó, representa el error estándar que se supone tiene cada promedio. Los resultados de estas comparaciones se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8. Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a nivel fijo de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	1	5.06 <sup>a</sup>	7.56 <sup>b</sup>	7.56 <sup>b</sup>	4.53 <sup>a</sup>	7.97 <sup>b</sup>	11.86 <sup>c</sup>					
	5	3.26 <sup>a</sup>	9.00 <sup>d</sup>	11.56 <sup>e</sup>	6.46 <sup>b</sup>	5.22 <sup>b</sup>	19.86 <sup>f</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
	10	11.56 <sup>c</sup>	9.41 <sup>b</sup>	7.64 <sup>a</sup>	11.61 <sup>c</sup>	14.26 <sup>d</sup>	9.81 <sup>b</sup>					
48	1	7.00 <sup>a</sup>	9.14 <sup>b</sup>	9.74 <sup>b</sup>	6.72 <sup>a</sup>	14.54 <sup>c</sup>	18.46 <sup>d</sup>					
	5	4.86 <sup>a</sup>	11.01 <sup>b</sup>	15.00 <sup>d</sup>	10.26 <sup>b</sup>	12.00 <sup>c</sup>	19.84 <sup>e</sup>	0.78	0.79	0.82	0.83	0.85
	10	18.86 <sup>d</sup>	6.03 <sup>a</sup>	11.86 <sup>c</sup>	14.83 <sup>d</sup>	9.81 <sup>b</sup>	12.40 <sup>c</sup>					
72	1	6.06 <sup>a</sup>	11.86 <sup>b</sup>	12.67 <sup>c</sup>	8.10 <sup>a</sup>	18.61 <sup>d</sup>	17.63 <sup>d</sup>					
	5	5.58 <sup>a</sup>	14.04 <sup>c</sup>	17.00 <sup>d</sup>	11.52 <sup>b</sup>	15.32 <sup>c</sup>	26.41 <sup>e</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
	10	20.47 <sup>d</sup>	10.24 <sup>b</sup>	15.17 <sup>b</sup>	15.63 <sup>b</sup>	17.66 <sup>c</sup>	21.87 <sup>e</sup>					
96	1	7.26 <sup>a</sup>	11.63 <sup>b</sup>	11.01 <sup>c</sup>	9.10 <sup>a</sup>	22.52 <sup>d</sup>	23.86 <sup>d</sup>					
	5	11.86 <sup>b</sup>	13.30 <sup>c</sup>	24.76 <sup>e</sup>	10.75 <sup>a</sup>	19.13 <sup>c</sup>	26.77 <sup>e</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
	10	18.24 <sup>d</sup>	8.52 <sup>a</sup>	17.17 <sup>c</sup>	16.24 <sup>b</sup>	16.86 <sup>c</sup>	17.56 <sup>c</sup>					
120	1	9.06 <sup>a</sup>	17.17 <sup>d</sup>	12.66 <sup>c</sup>	10.16 <sup>a</sup>	26.86 <sup>f</sup>	22.34 <sup>e</sup>					
	5	9.51 <sup>a</sup>	11.04 <sup>b</sup>	26.61 <sup>d</sup>	10.60 <sup>b</sup>	18.03 <sup>c</sup>	29.87 <sup>f</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94
	10	17.66 <sup>c</sup>	12.02 <sup>b</sup>	15.31 <sup>b</sup>	18.03 <sup>c</sup>	27.87 <sup>f</sup>	17.66 <sup>c</sup>					

R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a,b,c,d,e,f-Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu\text{mol}$  de ácido láctico liberado.

Al hacer un análisis global de todas estas comparaciones, se encontró lo siguiente:

Para la concentración de enzima de 1 mg/mL, los valores de actividad más altos corresponden a las formulaciones de liposomas que contienen 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y también dicetilfosfato, siendo el valor más alto aquél que corresponde a la formulación que contiene 5.4  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato, excepto para el tiempo de 120 min en el cual el valor más alto es el de la formulación con 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato.

Los mayores valores de actividad obtenidos para la concentración de enzima de 5 mg/mL se encuentran en la formulación que contiene 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (742), seguidas por la formulación que contiene 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (722), pero sí se observa diferencia significativa entre ellas para todos los tiempos. En esta concentración de enzima hay que hacer notar que los valores decrecen conforme disminuyen la concentración de dicetilfosfato y la concentración de colesterol, en este orden.

En cuanto a lo que corresponde a la concentración de enzima de 10 mg/mL, se aprecia que la formulación 741 es la que muestra mejores resultados, ya que para el tiempo de 24 min el valor más alto corresponde a la formulación que contiene la concentración de 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741). En contraparte, para el tiempo de 48 min las formulaciones que carecen de dicetilfosfato (720 y 740), son las que muestran los mayores valores, no existiendo diferencia significativa entre ellas. Al observar el valor correspondiente a 741, se aprecia que éste debió haber sido el mismo o de mayor magnitud que el del tiempo que lo antecede (24 min) y con ello dicho valor no tendría diferencia significativa con el correspondiente a 720 o sería mayor. Lo anterior sugiere un error experimental en la determinación de la cantidad de ácido butírico liberado en este tiempo para la formulación 741; para el tiempo de 72 min es la formulación con mayor proporción en componentes (742) la de más alto valor, con diferencia significativa respecto a las otras formulaciones. A los 96 min de reacción, es nuevamente la formulación que contiene 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y que carece de dicetilfosfato (720), la que presenta el mayor valor, no siendo significativa la diferencia con la formulación de 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741). Finalmente, para el tiempo de 120 min la formulación con 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741) es la que presenta el mayor valor y es diferente de manera significativa a las otras formulaciones.

Los mayores valores de actividad obtenidos para la concentración de enzima de 5 mg/mL se encuentran en la formulación que contiene 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (742), seguidas por la formulación que contiene 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (722), pero sí se observa diferencia significativa entre ellas para todos los tiempos. En esta concentración de enzima hay que hacer notar que los valores decrecen conforme disminuyen la concentración de dicetilfosfato y la concentración de colesterol, en este orden.

En cuanto a lo que corresponde a la concentración de enzima de 10 mg/mL, se aprecia que la formulación 741 es la que muestra mejores resultados, ya que para el tiempo de 24 min el valor más alto corresponde a la formulación que contiene la concentración de 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741). En contraparte, para el tiempo de 48 min las formulaciones que carecen de dicetilfosfato (720 y 740), son las que muestran los mayores valores, no existiendo diferencia significativa entre ellas. Al observar el valor correspondiente a 741, se aprecia que éste debió haber sido el mismo o de mayor magnitud que el del tiempo que lo antecede (24 min) y con ello dicho valor no tendría diferencia significativa con el correspondiente a 720 o sería mayor. Lo anterior sugiere un error experimental en la determinación de la cantidad de ácido butírico liberado en este tiempo para la formulación 741; para el tiempo de 72 min es la formulación con mayor proporción en componentes (742) la de más alto valor, con diferencia significativa respecto a las otras formulaciones. A los 96 min de reacción, es nuevamente la formulación que contiene 5.7  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y que carece de dicetilfosfato (720), la que presenta el mayor valor, no siendo significativa la diferencia con la formulación de 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741). Finalmente, para el tiempo de 120 min la formulación con 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  de colesterol y 2.85  $\mu\text{mol/mL}$  de dicetilfosfato (741) es la que presenta el mayor valor y es diferente de manera significativa a las otras formulaciones.

Nuevamente la formulación con un contenido de colesterol de 11.4  $\mu\text{mol/mL}$  es la que da los mejores resultados a pesar de que sólo contiene 2.85  $\mu\text{mol}$  de dicetilfosfato a diferencia de los dos casos anteriores.

Como resultado de este análisis estadístico se encontró lo siguiente:

**Efecto de la concentración de enzima.**- La formulación de liposomas que contiene las mayores proporciones de componentes (742) por mL de liposomas (20  $\mu\text{mol}$  de lecitina, 11.4  $\mu\text{mol}$  de colesterol y 5.7  $\mu\text{mol}$  de dicetilfosfato) es la que muestra los mayores valores de actividad lipolítica cuando se tiene 1 mg/mL de la enzima. Las formulaciones 741 y 742 presentan diferencias significativas en la velocidad inicial de reacción (hasta los 48 min). Los valores determinados a los 72 y 96 min no son diferentes.

En el caso de la formulación 742 se presentó un pequeño descenso en la actividad mostrada a los 120 min. Esto debe ser debido a un error experimental pues el ácido butírico generado y determinado en el tiempo anterior debería, por lo menos, ser de la misma magnitud. Lo anterior puede observarse de manera esquemática en la Tabla 9.

TABLA 9\*. Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a 1 mg/mL de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	1	5.08 <sup>a</sup>	7.59 <sup>b</sup>	7.59 <sup>b</sup>	4.53 <sup>a</sup>	7.97 <sup>b</sup>	11.89 <sup>c</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
48	1	7.00 <sup>a</sup>	9.14 <sup>b</sup>	9.74 <sup>b</sup>	8.72 <sup>a</sup>	14.54 <sup>c</sup>	18.48 <sup>d</sup>	0.76	0.79	0.82	0.83	0.85
72	1	8.08 <sup>a</sup>	11.89 <sup>b</sup>	12.87 <sup>c</sup>	8.10 <sup>a</sup>	18.81 <sup>d</sup>	17.43 <sup>d</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
96	1	7.29 <sup>a</sup>	11.83 <sup>b</sup>	11.01 <sup>c</sup>	9.18 <sup>a</sup>	22.52 <sup>e</sup>	23.88 <sup>e</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
120	1	9.08 <sup>a</sup>	17.17 <sup>d</sup>	12.85 <sup>c</sup>	10.18 <sup>b</sup>	28.88 <sup>f</sup>	22.34 <sup>e</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94

\*: EXTRAÍDA DE LA TABLA 8. R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a, b, c, d, e, f = Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberado.

La alta actividad mostrada por la formulación 741 es relevante si se observa el porcentaje de enzima retenido por esta formulación, que fue de 19.03% (Tabla 10). Dicho valor es uno de los más bajos en retención de entre todas las demás formulaciones y sin embargo la actividad lipolítica que muestra es superior a las demás, o similar a 742. Este resultado sugiere que tanto el dicetilfosfato y el colesterol actúan como efectores positivos sobre la enzima. La suposición se refuerza con los resultados obtenidos para la formulación 742 ya que a pesar de que ésta muestra porcentajes de enzima retenida similares a 722 y 721, la cantidad de ácido butírico liberado es mayor que el de las dos anteriores.

**TABLA 10 \***. Porcentaje de lipasa de *Candida cylindracea* retenida dentro de liposomas multilamelares a la concentración de 1 mg/mL de enzima, 144 h después de formados.

	FORMULACIÓN			[ENZIMA] (mg/mL)		
	LECITINA ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COLESTEROL ( $\mu\text{mol/mL}$ )	DICETILFOSFATO ( $\mu\text{mol/mL}$ )	1	5	10
				ENZIMA ATRAPADA %		
<b>720</b>	20	5.7	0	<b>19.86</b>	21.60	12.11
<b>721</b>	20	5.7	2.85	<b>23.90</b>	21.45	16.86
<b>722</b>	20	5.7	5.7	<b>23.01</b>	20.00	14.90
<b>740</b>	20	11.4	0	<b>17.69</b>	21.88	11.83
<b>741</b>	20	11.4	2.85	<b>19.03</b>	23.81	15.43
<b>742</b>	20	11.4	5.7	<b>23.03</b>	25.67	24.49

\*: Extraída de la tabla 3.

Cuando se usa la concentración de enzima de 5 mg/mL es nuevamente la formulación 742 la que presenta los mayores valores de actividad lipolítica, en todos los tiempos de reacción. En seguida están los valores dados por la formulación 722, que a esta concentración de enzima es la que retiene menor porcentaje de proteína (20.00%) con respecto a las restantes. Esto puede apreciarse en las Tablas 11 y 12.



TABLA 11\*. Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas con una concentración inicial de 5 mg/mL de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	5	3.28 <sup>a</sup>	9.00 <sup>d</sup>	11.56 <sup>e</sup>	8.45 <sup>c</sup>	5.22 <sup>b</sup>	19.86 <sup>f</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
48	5	4.88 <sup>a</sup>	11.01 <sup>d</sup>	15.09 <sup>e</sup>	10.28 <sup>b</sup>	12.00 <sup>c</sup>	19.86 <sup>f</sup>	0.78	0.79	0.82	0.83	0.85
72	5	5.58 <sup>a</sup>	14.84 <sup>c</sup>	17.00 <sup>d</sup>	11.52 <sup>b</sup>	15.32 <sup>c</sup>	20.41 <sup>f</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
96	5	11.66 <sup>b</sup>	13.30 <sup>c</sup>	24.78 <sup>e</sup>	10.75 <sup>b</sup>	19.13 <sup>d</sup>	20.77 <sup>f</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
120	5	9.51 <sup>b</sup>	11.04 <sup>b</sup>	28.61 <sup>d</sup>	10.80 <sup>b</sup>	18.03 <sup>c</sup>	20.87 <sup>f</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94

\*: EXTRAÍDA DE LA TABLA 8. R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a, b, c, d, e, f = Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberado.

TABLA 12\*. Porcentaje de lipasa de *Candida cylindracea* retenida dentro de liposomas multilamelares a la concentración de 5 mg/mL de enzima, 144 h después de formados.

FORMULACIÓN	[ENZIMA] (mg/mL)			ENZIMA ATRAPADA %		
	1	5	10			
LECTINA ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COLESTEROL ( $\mu\text{mol/mL}$ )	DICETILFOSFATO ( $\mu\text{mol/mL}$ )				
720	20	5.7	0	19.86	21.60	12.11
721	20	5.7	2.85	23.90	21.45	16.86
722	20	5.7	5.7	23.01	20.00	14.90
740	20	11.4	0	17.69	21.88	11.83
741	20	11.4	2.85	19.03	23.81	15.43
742	20	11.4	5.7	23.03	25.67	24.49

\*: Extraída de la tabla 3.

Para la concentración de 1 mg/mL de enzima la secuencia de los valores de actividad lipolítica por formulación son de esta forma: 742 > 741 > 722, donde 741 era la formulación con menor cantidad de enzima (Tabla 13), mientras que

**TABLA 13 \*.** Prueba de intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas con una concentración de 1 mg/mL de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	1	5.06 <sup>a</sup>	7.90 <sup>b</sup>	7.89 <sup>b</sup>	4.53 <sup>a</sup>	7.87 <sup>b</sup>	11.86 <sup>c</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
48	1	7.00 <sup>a</sup>	9.14 <sup>b</sup>	8.74 <sup>b</sup>	6.72 <sup>a</sup>	14.84 <sup>c</sup>	18.46 <sup>d</sup>	0.78	0.79	0.82	0.83	0.85
72	1	8.06 <sup>a</sup>	11.88 <sup>b</sup>	12.87 <sup>c</sup>	8.10 <sup>a</sup>	18.61 <sup>d</sup>	17.59 <sup>d</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
96	1	7.29 <sup>a</sup>	11.63 <sup>b</sup>	11.81 <sup>b</sup>	9.16 <sup>a</sup>	22.83 <sup>d</sup>	23.88 <sup>d</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
120	1	9.06 <sup>a</sup>	17.17 <sup>d</sup>	12.66 <sup>b</sup>	10.18 <sup>b</sup>	28.08 <sup>e</sup>	22.34 <sup>d</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94

\*: EXTRAÍDA DE LA TABLA 6. R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a, b, c, d, e, f = Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberado.

para la concentración de 5 mg/mL de enzima la secuencia de valores es de esta forma: 742 > 722 > 741 donde ahora 722 es la formulación con menos enzima retenida. Los resultados anteriores sirven para mostrar que el efecto dado por incluir en la formulación de los liposomas dos proporciones de colesterol (5.7  $\mu\text{mol}$ ) y dos proporciones de dicetilfosfato (5.7  $\mu\text{mol}$ ) es el mismo que si se incluyen cuatro proporciones de colesterol (11.4  $\mu\text{mol}$ ) y tan sólo una proporción de dicetilfosfato (2.85  $\mu\text{mol}$ ) para efectos de activación de la enzima (Tabla 14).

**TABLA 14 \*.** Prueba de intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas con una concentración inicial de 5 mg/mL de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	5	3.28 <sup>a</sup>	9.00 <sup>d</sup>	11.55 <sup>b</sup>	8.45 <sup>c</sup>	5.22 <sup>a</sup>	19.89 <sup>e</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
48	5	4.88 <sup>a</sup>	11.01 <sup>b</sup>	16.88 <sup>d</sup>	10.26 <sup>b</sup>	12.88 <sup>c</sup>	18.84 <sup>d</sup>	0.78	0.79	0.82	0.83	0.85
72	5	5.58 <sup>a</sup>	14.64 <sup>c</sup>	17.88 <sup>d</sup>	11.52 <sup>b</sup>	16.33 <sup>c</sup>	28.41 <sup>e</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
96	5	11.88 <sup>b</sup>	13.30 <sup>c</sup>	24.78 <sup>e</sup>	10.75 <sup>b</sup>	18.13 <sup>d</sup>	38.77 <sup>f</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
120	5	9.51 <sup>b</sup>	11.04 <sup>b</sup>	28.81 <sup>e</sup>	10.80 <sup>b</sup>	16.83 <sup>c</sup>	28.87 <sup>e</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94

\*: EXTRAÍDA DE LA TABLA 6. R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a, b, c, d, e, f = Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico liberado.

Es importante mencionar que al adicionar dicetilfosfato y colesterol en un experimento realizado con enzima libre, no ejercieron este efecto sobre la actividad lipolítica (Tablas 15 y 16). Por lo tanto este efecto activador sólo se aprecia cuando los componentes son parte de una membrana fosfolipídica.

**TABLA 15.** Actividad lipolítica de la enzima libre de *C. cylindracea* (1 mg/mL) con distintos componentes.

t (s)	Enzima libre	+ 30 % lactosa	+ 11.4 $\mu$ mol colesterol	+ 11.4 $\mu$ mol colesterol + 8.7 $\mu$ mol dicetilfosfato
0				
30	22.64	20.44	22.01	19.65
60	37.26	27.99	30.66	26.26
90	60.06	46.54	50.31	40.57
120	74.53	66.35	67.77	62.26
150	80.86	75.79	77.04	74.84
180	85.69	82.39	82.55	78.46
210	89.47	85.38	85.85	83.49
240	91.19	88.68	88.99	86.95
270	93.40	91.04	91.35	87.74
300	94.97	92.45	93.24	90.72
330	96.54	94.34	94.81	92.61
360	97.33	95.60	96.23	93.71

Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu$ mol de ácido butírico liberado.

**TABLA 16.** Actividad lipolítica de la enzima libre de *C. cylindracea* (10 mg/mL) con distintos componentes.

t (s)	Enzima libre	+ 30 % lactosa	+ 11.4 $\mu$ mol colesterol	+ 11.4 $\mu$ mol colesterol + 8.7 $\mu$ mol dicetilfosfato
0				
30	70.13	63.21	54.09	61.01
60	87.26	86.64	85.06	84.43
90	92.77	93.71	91.98	91.67
120	95.91	97.33	96.38	95.13
150	97.80	99.69	98.27	97.48
180	99.21	100.79	100.31	99.21
210	100.63	101.73	100.94	100.63

Los valores de actividad se encuentran expresados en  $\mu$ mol de ácido butírico liberado.

Otro indicio de que el dicetilfosfato puede ser un efector positivo para la actividad lipolítica de la lipasa de *C. cylindracea* se observa también en la Tabla 17. Las formulaciones que contienen dos proporciones de dicetilfosfato (722 y 742) y que corresponden a la concentración de enzima de 5 mg/mL, muestran que para todos los tiempos a lo largo de la reacción, éstas presentaron los valores más altos de ácido butírico liberado, aún por encima de los valores correspondientes a las muestras que

contenían originalmente enzima en concentración de 10 mg/mL. Cuando la formulación sólo contiene una proporción de dicetilfosfato (2.85  $\mu$ mol) no se aprecia el efecto positivo en todos los tiempos de reacción establecidos.

TABLA 17 \*. Prueba de intervalos Múltiples de Duncan para las formulaciones de liposomas a nivel fijo de 5 mg/mL de enzima.

Tiempo (min)	Enzima (mg/mL)	FORMULACIÓN						R2	R3	R4	R5	R6
		720	721	722	740	741	742					
24	1	5.09 <sup>a</sup>	7.59 <sup>b</sup>	7.59 <sup>b</sup>	4.53 <sup>a</sup>	7.97 <sup>b</sup>	11.56 <sup>c</sup>					
	5	3.29 <sup>a</sup>	9.00 <sup>d</sup>	11.89 <sup>e</sup>	6.46 <sup>c</sup>	5.22 <sup>b</sup>	19.89 <sup>f</sup>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.88
	10	11.56 <sup>c</sup>	9.41 <sup>b</sup>	7.64 <sup>b</sup>	11.61 <sup>c</sup>	14.26 <sup>d</sup>	9.81 <sup>b</sup>					
48	1	7.00 <sup>b</sup>	9.14 <sup>b</sup>	9.74 <sup>b</sup>	6.72 <sup>b</sup>	14.54 <sup>c</sup>	15.40 <sup>d</sup>					
	5	4.66 <sup>a</sup>	11.01 <sup>b</sup>	16.89 <sup>e</sup>	10.26 <sup>b</sup>	12.00 <sup>c</sup>	16.84 <sup>d</sup>	0.76	0.79	0.82	0.83	0.85
	10	15.00 <sup>d</sup>	6.03 <sup>a</sup>	11.96 <sup>c</sup>	14.63 <sup>d</sup>	9.81 <sup>b</sup>	12.40 <sup>c</sup>					
72	1	8.09 <sup>b</sup>	11.69 <sup>b</sup>	12.87 <sup>c</sup>	6.10 <sup>b</sup>	16.61 <sup>d</sup>	17.53 <sup>d</sup>					
	5	5.56 <sup>a</sup>	14.64 <sup>d</sup>	17.89 <sup>e</sup>	11.52 <sup>b</sup>	15.32 <sup>c</sup>	26.41 <sup>f</sup>	0.92	0.97	1.00	1.02	1.03
	10	20.47 <sup>f</sup>	10.24 <sup>b</sup>	15.17 <sup>d</sup>	15.63 <sup>d</sup>	17.66 <sup>d</sup>	21.97 <sup>e</sup>					
96	1	7.29 <sup>b</sup>	11.63 <sup>b</sup>	11.01 <sup>b</sup>	9.16 <sup>b</sup>	22.52 <sup>d</sup>	23.06 <sup>d</sup>					
	5	11.66 <sup>b</sup>	13.30 <sup>c</sup>	24.79 <sup>f</sup>	10.79 <sup>b</sup>	19.13 <sup>d</sup>	26.77 <sup>e</sup>	0.81	0.85	0.88	0.89	0.91
	10	19.24 <sup>d</sup>	8.52 <sup>a</sup>	17.17 <sup>c</sup>	16.24 <sup>d</sup>	16.89 <sup>d</sup>	17.56 <sup>c</sup>					
120	1	9.09 <sup>b</sup>	17.17 <sup>d</sup>	12.66 <sup>c</sup>	10.16 <sup>b</sup>	26.09 <sup>e</sup>	22.34 <sup>d</sup>					
	5	9.51 <sup>b</sup>	11.04 <sup>b</sup>	26.81 <sup>f</sup>	10.60 <sup>b</sup>	16.03 <sup>c</sup>	26.87 <sup>e</sup>	0.84	0.89	0.91	0.93	0.94
	10	17.66 <sup>d</sup>	12.02 <sup>b</sup>	15.31 <sup>b</sup>	16.03 <sup>c</sup>	27.07 <sup>f</sup>	17.66 <sup>c</sup>					

\*: EXTRAÍDA DE LA TABLA 6. R es el valor crítico de Duncan para comparaciones múltiples. a, b, c, d, e, f = Valores promedio con superíndices distintos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores de actividad están expresados en  $\mu$ mol de ácido butírico liberado.

En algunos casos puede apreciarse que las muestras que contienen enzima proveniente de la concentración de 1 mg/mL, muestran valores más altos de ácido butírico liberado que los correspondientes a 10 mg/mL a pesar que la cantidad promedio de enzima contenida en las primeras es siete veces menor. Los valores de actividad que presentaron las formulaciones correspondientes a la concentración de 10 mg de enzima por mL no muestran una tendencia definida.

## 7. conclusiones

- ◆ Se obtuvieron liposomas macrovesiculares estables que lograron la retención de la lipasa de *Candida cylindracea*.
- ◆ Los liposomas macrovesiculares formados lograron una retención, de la enzima lipolítica de *Candida cylindracea*, que va del 12% al 25%. Estos valores dependen de las diferentes proporciones de los componentes utilizados en las formulaciones.
- ◆ La combinación de dicetilfosfato con colesterol, como componentes de los liposomas, a una proporción de 4:2 micromolar y utilizando 7 proporciones (20  $\mu\text{mol}$ ) de lecitina, induce la estabilidad de los liposomas macrovesiculares formados, manifestándose esto con una mayor retención de la lipasa de *Candida cylindracea*.
- ◆ El añadir dicetilfosfato a las formulaciones de liposomas en cantidades de 2.85 y 5.7  $\mu\text{mol/mL}$ , favorece la estabilidad de los liposomas macrovesiculares así como también la retención de la enzima lipolítica de *Candida cylindracea*.
- ◆ El utilizar 2 ó 4 proporciones micromolares (5.7 y 11.4  $\mu\text{mol}$ ) de colesterol sin añadir dicetilfosfato en las formulaciones de liposomas, no muestra tener un efecto significativo en la estabilidad de los liposomas macrovesiculares.
- ◆ El mejor tiempo para la evaluación de los liposomas macrovesiculares, que contienen la lipasa de *Candida cylindracea* es hasta transcurridas 144 h de la formación de éstos, ya que es hasta este tiempo cuando se observa una interacción enzima-formulación.
- ◆ La combinación de los componentes colesterol y dicetilfosfato en proporciones micromolares de 4 y 2 (5.7 y 2.85  $\mu\text{mol}$ ) respectivamente, utilizados en la

elaboración de liposomas macrovesiculares para el atrapamiento de la lipasa de *Candida cylindracea*, actúan como un efector positivo de la actividad de esta enzima solo cuando estos componentes forman parte de una membrana fosfolipídica.

- ◆ Al utilizar 4 proporciones de colesterol (11.4  $\mu\text{mol}$ ) y 1 proporción de dicetilfosfato (2.85  $\mu\text{mol}$ ) en la preparación de liposomas macrovesiculares, se observó el mismo efecto sobre la actividad de la lipasa de *Candida cylindracea* que cuando se utilizan 2 proporciones micromolares de colesterol en combinación con 1 proporción de dicetilfosfato.
- ◆ La formulación de liposomas que contiene 7 proporciones de lecitina (20  $\mu\text{mol/mL}$ ), 4 proporciones de colesterol (11.4  $\mu\text{mol/mL}$ ) y 2 proporciones de dicetilfosfato (5.7  $\mu\text{mol/mL}$ ) muestra ser la mejor, ya que resulta en los más altos valores de actividad para la enzima lipolítica de *Candida cylindracea*.

## 8. bibliografía



1. Alkhalaf, W., El-Soda, M., Gripon, J.C. and Vassal, L.; **Acceleration of Cheese Ripening with Liposomes-Entrapped Proteinase: Influence of Liposomes Net Charge.** *Journal of Dairy Science*, **72**: 2233-8. (1989)
2. Arnold, R.G., Shahani, K.M. and Dwivedi, B.K. **Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products.** *Journal of Dairy Science*, **58**(8):1127-1143. (1975)
3. **Biotechnology and Bioengineering: Enzyme Modification of Dairy Products.** In: *Food Technology*, **40**(4): 114-120. (1986)
4. Bloch, K.; **Lipide metabolism.** John Wiley & sons, Inc. New York, USA. (1960).167-181.
5. Chen, J. P. and Chang, K.C. **Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Milk Fat in Lecithin Reverse Micelles.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76**(2): 98-104. (1993)
6. De Gier, J.;**The use of liposomes in the search for an understanding of the significance of membrane lipid diversity.** *Biochemical Society Transactions*, 912-914. (1988)
7. Deeth, H. C., Fitz-Gerald, C. H. and Snow, A. J.; **A Gas Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Free Fatty Acids in Milk and Milk Products.** *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **18**: 13-20. (1983)
8. Desnuelle, P.; **The Lipases.** In: *The Enzymes VII.* Boyer. Academic Press. New York, USA. (1975). 575-616.

9. Drachev, G.Y. Schipunov, Y.A. and Kostetsky, E.Y. **Some physico-chemical properties of phospholipids with choline and ethanolamine functional groups. Comparative characteristics and possible biological consequences of distinctions.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **813**: 243-252. (1985)
10. Dziezak, J.; **Microencapsulation and Encapsulated Ingredients.** *Food Technology*, **86**[4]: 135-153. (1988)
11. El-Soda, M.; **Acceleration of Cheese Ripening: Recent Advances.** *Journal of Food Protection*, **49**[5]: 395-399. (1986)
12. El-Soda, M. Pannell, L. and Olson, N. **Microencapsulated enzyme systems for the acceleration of cheese ripening.** *Journal of Microencapsulation*, **6**[3]: 319-326. (1989)
13. Espinosa, E. Sánchez, S. and Farrés, A.; **Nutritional Factors affecting Lipase Production by *Rhizopus delemar* CDBB H313.** *Biotechnology Letters*, **12**[3]: 209-214. (1990)
14. Fox, P.F., **Exogenous Enzymes in Dairy Technology- A Review.** *Journal of Food Biochemistry*, **17**:173-199. (1993)
15. Gregoriadis, G. **Enzyme Entrapment in Liposomes.** In: *Methods in Enzymology vol. XLIV. Immobilized Enzymes.* Edited by Klaus, M. Academic Press. USA. (1976). 218-227.
16. Hotani, H. **Transformation Pathways of Liposomes.** *Journal of Molecular Biology*, **178**: 113-120. (1984)

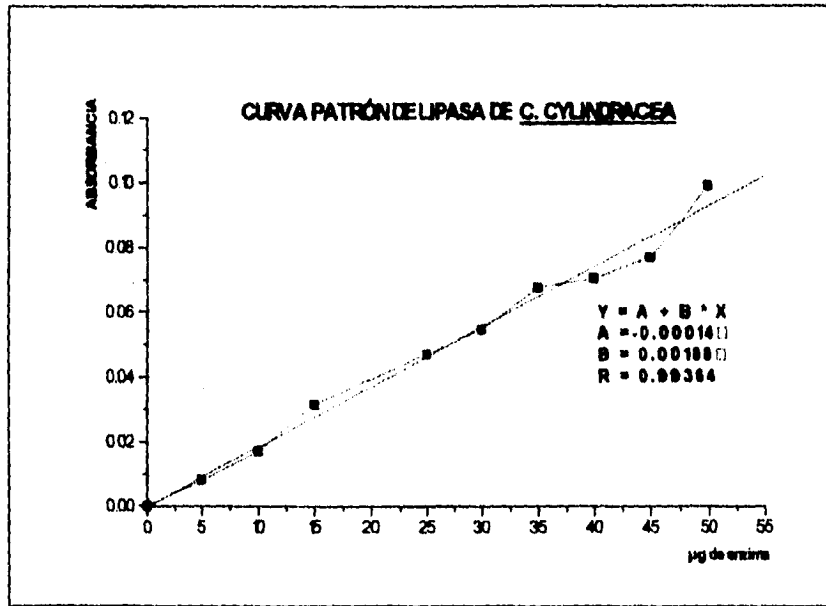
9. Drachev, G.Y. Schipunov, Y.A. and Kostetsky, E.Y. **Some physico-chemical properties of phospholipids with choline and ethanolamine functional groups. Comparative characteristics and possible biological consequences of distinctions.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **813**: 243-252. (1985)
10. Dziezak, J.; **Microencapsulation and Encapsulated Ingredients.** *Food Technology*, **95**(4): 135-153. (1988)
11. El-Soda, M.; **Acceleration of Cheese Ripening: Recent Advances.** *Journal of Food Protection*, **49**(5): 395-399. (1986)
12. El-Soda, M. Pannell, L. and Olson, N. **Microencapsulated enzyme systems for the acceleration of cheese ripening.** *Journal of Microencapsulation*, **6**(3): 319-326. (1989)
13. Espinosa, E. Sánchez, S. and Farrés, A.; **Nutritional Factors affecting Lipase Production by *Rhizopus delemar* CDBB H313.** *Biotechnology Letters*, **12**(3): 209-214. (1990)
14. Fox, P.F., **Exogenous Enzymes in Dairy Technology- A Review.** *Journal of Food Biochemistry*, **17**:173-199. (1993)
15. Gregoriadis, G. **Enzyme Entrapment in Liposomes.** In: **Methods in Enzymology vol. XLIV. Immobilized Enzymes.** Edited by Klaus, M. Academic Press. USA. (1976). 218-227.
16. Hotani, H. **Transformation Pathways of Liposomes.** *Journal of Molecular Biology*, **178**: 113-120. (1984)

17. Kilara, A. **Immobilized Proteases and Lipases**. *Process Biochemistry*, **16**(2): 25-27. (1981)
18. Kronberg, D., Dahlman, A., Carifors, J., Karlsson, J. and Artursson, P. **Preparation and Evaluation of Sterically Stabilized Liposomes: colloidal Stability, Serum Stability, Macrophage Uptake and Toxicity**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **79**(8): 667-71. (1990)
19. Magee, E.L. and Olson, N.F. **Microencapsulation of Cheese Ripening Systems: Stability of Microcapsules**. *Journal of Dairy Science*, **64**: 611-615. (1981)
20. Malcata, F.X., Reyes, H.R., García, H.S. Hill, C.G. and Amundson, C.H.; **Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases**. *Enzyme Microbial Technology*, **14**(6): 426-446. (1992)
21. Masson, G. **Advanced Techniques for Preparation and Characterization of Small Unilamellar Vesicles**. *Food Microstructure*, **8**: 11-14. (1989)
22. McKay, A.M., **Microbial carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1.) In food biotechnology**. *Letters in Applied Microbiology*, **18**:1-6. (1993)
23. McWilliam, A.S. and Stewart, G.A. **Production of multilamellar, small unilamellar and reverse-phase liposomes containing house dust mite allergens**. *Journal of Immunological Methods*, **121**: 53-60. (1989)
24. Ostro, M. **Liposomes**. *Scientific American*, **256**(1): 102-111. (1987)
25. Papahadjopoulos, D. **Liposomes: From Membrane Model to Therapeutic Applications**. *625<sup>th</sup> Meeting of Biochemical Society Transactions*, **16**: 910-911. (1987)

26. Payne, N.I.; Browning, I. and Hynes, C.A. **Characterization of Proliposomes.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**(4):330-333. (1986)
27. Peña, A. **Las membranas de las células.** Col. La Ciencia desde México. Fondo de Cultura Económica. México. (1986). 34-35.
28. Peterson, G.L. **Determination of Total Protein.** *Methods in Enzymology*, **91**: 95-119. (1983)
29. Piard, J.C., El-Soda, M., Alkhalaf, M., Rousseau, M., Demaszeaud, L., Vassal and Gripon, J.C. **Acceleration of Cheese Ripening with Liposome-Entrapped Proteinase.** *Biotechnology Letters*, **8**(4): 241-246. (1986)
30. Picón, A. Gaya, P. Medina, M. and Nuñez, M. **The Effect of Liposome Encapsulation of Chymosin Derived by Fermentation on Manchego Cheese Ripening.** *Journal of Dairy Science*, **77**: 16-23. (1994)
31. Sinil, K., Mitchell, S., Emil, Y et al. **Preparation of Multivesicular Liposomes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **728**:339-348. (1983)
32. Stauffer, C.E. **Enzyme Assays for Food Scientists.** Van Nostrand Reinhold. New York, USA. (1989). 187-198.
33. Talbott, L. L. and McCord, C. **The Use of Enzyme Modified Cheeses for Flavoring Processed Cheese Products.** 2<sup>nd</sup> Biennial Marschall International Cheese Conference. Madison, Wisconsin. USA. September 15-18. (1981)
34. Whitaker, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences.** Marcel Dekker, Inc. New York, USA. (1972). 483-489.

35. Yamane, T. **Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview**. Journal of the American Oil Chemists Society, **64**(12): 1657-1662. (1987)
36. Zygmunt, S.D. and Sharp, A.M. **News from the Interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases**. Trends in Biotechnology Science, **18**: 20-25. (1993)

# apéndice a



Gráfica 2.- Curva patrón elaborada con enzima lipolítica de *Candida cylindracea*, tomando en cuenta 30% de lactosa como extendedor.