

119



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DIRIGIDA DE ÉSTERES  
DE POLIOLES UTILIZANDO TÉCNICAS DE  
INGENIERÍA DE SOLVENTES”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO QUÍMICO**  
P R E S E N T A  
**FABIO PEZZOTTI ROBLETO**

MÉXICO, D.F.



2000

EXAMENES DE GRADUACIÓN  
FACULTAD DE QUÍMICA



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).

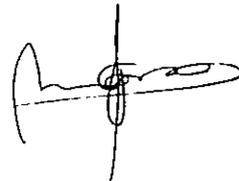
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**Jurado Asignado:**

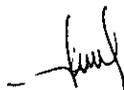
Presidente	Claudio Armando Aguilar Martínez
Vocal	Mauro Cruz Morales
Secretario	Edmundo Castillo Rosales
1er. suplente	Agustín López-Munguía Canales
2do. suplente	Irma Cruz Gavilán

Lugar donde se realizó este trabajo: Laboratorio de Ingeniería Enzimática  
dentro del grupo del  
Dr. Agustín López-Munguía Canales  
Departamento de Bioingeniería  
Instituto de Biotecnología

Asesor de Trabajo: Dr. Edmundo Castillo Rosales



Sustentante: Fabio Pezzotti Robleto



A mis padres y hermanos

A Paola

A mi Familia

Nothing exists outside the moment.

Irvine Welsh

Hace falta toda clase de hombres para hacer un mundo.

Laurence Durrell

## **Agradecimientos**

Al Dr. Agustín López-Munguía por aceptarme en su grupo de investigación y por su incondicional apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. Edmundo Castillo por dirigir esta tesis y por ser mas que un jefe, un amigo.

A mis padres y hermanos por el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida.

A Paola por estar siempre en mi cabeza.

Al técnico laboratorista Fernando González por la ayuda técnica en la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ingeniería Enzimática por hacer del laboratorio mi segunda casa y por momentos tan divertidos (Pelos, Pelos!!).

A la UNAM por brindarme la mejor educación académica y humana.

# Indice General

<b>Indice General</b> .....	<b>2</b>
<b>Indice de Figuras</b> .....	<b>5</b>
<b>Indice de Tablas</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Resumen</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Antecedentes</b> .....	<b>13</b>
<i>3.1 Generalidades sobre los Sistemas de Emulsión</i> .....	13
3.1.1 Estructura de Tensoactivos.....	15
3.1.2 Balance Hidrofílico-Lipofílico (BHL) .....	17
<i>3.2 Propiedades y Aplicaciones de Ésteres de Polioles</i> .....	20
<i>3.3 Síntesis Química de Ésteres de Polioles</i> .....	22
<i>3.4 Biosurfactantes</i> .....	24
<i>3.5 Reacciones de Síntesis Enzimática en Medios No-Convencionales</i> .....	26
3.5.1 Reacciones de Hidrólisis Inversa .....	26
3.5.2 Lipasas .....	31
3.5.3 Reacciones Catalizadas por Lipasas .....	32
<i>3.6 Síntesis Enzimática de Esteres de Polioles</i> .....	33
3.6.1 Reacciones de Transesterificación: .....	33
3.6.2 Reacciones de Esterificación Directa .....	34
<i>3.7 Propiedades Termodinámicas del Medio de Reacción</i> .....	38
3.7.1 Uso de la Ingeniería de Solventes .....	40
3.7.2 UNIFAC .....	42
<i>3.8 Xilitol</i> .....	43

3.9 Conclusiones Generales del Estudio Bibliográfico .....	46
<b>4 Objetivos .....</b>	<b>48</b>
4.1 Objetivo General.....	48
4.2 Objetivos Particulares.....	48
<b>5 Materiales y Métodos.....</b>	<b>49</b>
5.1 Materiales .....	49
5.2 Métodos.....	49
5.2.1 Síntesis Enzimática de Ésteres de Poliioles.....	49
5.2.2 Análisis Cualitativo del Medio de Reacción.....	50
5.2.3 Análisis Cuantitativo del Medio de Reacción.....	51
5.2.4 Purificación de los Productos de Reacción.....	52
<b>6 Resultados y Discusiones .....</b>	<b>53</b>
6.1 Síntesis Enzimática de Esteres de Xilitol y Acido Oléico .....	53
6.1.1 Reacciones de Esterificación de Xilitol con Acido Oléico.....	53
6.1.2 Desarrollo de los Métodos Analíticos.....	58
6.2 Caracterización de los Principales Productos de Reacción.....	59
6.2.1 Desarrollo de las Metodologías de Purificación y Recuperación de Productos .....	59
6.2.2 Propiedades Físicas de los Monoésteres .....	64
6.3 Influencia del Medio de Reacción en la Síntesis Enzimática .....	65
6.3.1 Síntesis Enzimática de Esteres de Xilitol y Acido Oléico en Diferentes Medios de Reacción .....	65
6.4 Modelamiento Teórico del Sistema de Reacción.....	72
6.5 Estudio de la Cinética de Reacción en 2-Metil-2-Butanol (2M2B) .....	76
6.6 Estudio de las Relaciones Estequiométricas Xilitol-Acido Oléico .....	80
6.7 Reacciones con Sacarosa .....	83

<b>7 Conclusiones .....</b>	<b>86</b>
<b>8 Perspectivas .....</b>	<b>88</b>
<b>9 Anexo A Método UNIFAC .....</b>	<b>90</b>
<b>10 Bibliografía .....</b>	<b>92</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> Tipos de emulsiones y forma en que se establece las separaciones de fases.....	14
<b>Figura 2.2</b> Representación esquemática de la estructura de un tensoactivo. .....	15
<b>Figura 2.3</b> Representación esquemática de las diferentes estructuras de algunos polioles. ....	25
<b>Figura 2.4</b> Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las lipasas. ....	32
<b>Figura 2.5</b> Reacción de formación del complejo de PBAC (ácido fenilborónico) con glucosa.....	36
<b>Figura 2.6</b> Esquema general de las reacciones de esterificación del xilitol y ácido graso.....	41
<b>Figura 5.1</b> Representación esquemática de las reacciones de esterificación del xilitol y ácido oléico.....	53
<b>Figura 5.2</b> Análisis de TLC de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico en diferentes medios de reacción.....	55
<b>Figura 5.3</b> Análisis de HPLC de los productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico en diferentes medios de reacción.....	57
<b>Figura 5.4</b> Metodología de purificación de los diferentes productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico. ....	62
<b>Figura 5.5</b> Análisis por HPLC de fracciones de purificado de monoésteres, diésteres y triésteres .....	63
<b>Figura 5.6</b> Cromatograma de TLC en el que se muestra la influencia del medio de reacción sobre la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.....	67
<b>Figura 5.7</b> Influencia del medio de reacción sobre las conversiones al equilibrio de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.....	68
<b>Figura 5.8</b> Influencia del medio de reacción sobre el porcentaje de moles producidas de monoésteres, diésteres y triésteres de xilitol y ácido oléico. .....	69

<b>Figura 5.9</b> Constantes de equilibrio de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico .....	71
<b>Figura 5.10</b> Influencia de la hidrofobicidad del medio de reacción sobre las actividades termodinámicas de monoéster, diéster y triéster de xilitol y ácido oléico a concentraciones 5, 10 y 50 mM. ....	75
<b>Figura 5.11</b> Cinética de reacción para la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico. ....	77
<b>Figura 5.12</b> Influencia de la relación xilitol/ácido oléico sobre la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico en 2M2B.....	82
<b>Figura 5.13</b> Análisis de TLC de la síntesis enzimática de ésteres de sacarosa y ácido oléico.....	84

## Indice de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> Grupos polares e hidrofóbicos mas comunes utilizados para la producción de tensoactivos. ....	16
<b>Tabla 2.2</b> Clasificación de tensoactivos de acuerdo a la naturaleza de los grupos polares presentes en la molécula.....	17
<b>Tabla 2.3</b> Aplicaciones de agentes tensoactivos de acuerdo a su valor de BHL. ....	18
<b>Tabla 2.4</b> Emulsificantes comerciales, su composición y valor de BHL. ....	19
<b>Tabla 2.5</b> Valores de BHL para algunos emulsificantes puros.....	19
<b>Tabla 2.6</b> Valores de BHL de ésteres de sorbitán. ....	20
<b>Tabla 2.7</b> Ventajas y desventajas de la síntesis química de ésteres de polioles. ....	23
<b>Tabla 2.8</b> Ejemplos de reacciones de esterificación en medios no-convencionales. ....	27
<b>Tabla 2.9</b> Coeficientes de partición octanol/agua (log P) de algunos disolventes orgánicos. ....	39
<b>Tabla 4.1</b> Sistema de fases de elución para el análisis de las reacciones de síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico por cromatografía en capa fina (TLC).....	50
<b>Tabla 5.2</b> Gradiente de flujo para el análisis de diésteres y triésteres de xilitol y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). ....	51
<b>Tabla 5.1</b> Composición del medio de reacción de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol.....	54
<b>Tabla 5.2</b> Gradiente de flujo para el análisis de diésteres y triésteres de xilitol mediante HPLC.....	59
<b>Tabla 5.3</b> Mezclas de disolventes utilizados para la síntesis enzimática de ésteres de xilitol.....	65
<b>Tabla 5.4</b> Coeficientes de actividad termodinámica de monoéster, diéster y triéster de xilitol y ácido oléico para concentraciones 5, 10 y 100 mM en diferentes medios de reacción. ....	73

<b>Tabla 5.5</b> Actividades termodinámicas de monoéster, diéster y triéster de xilitol y ácido oléico para concentraciones 5, 10 y 100 mM en diferentes medios de reacción. ....	74
<b>Tabla 5.6</b> Cuantificación al equilibrio para sustratos y productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico. ....	79
<b>Tabla 5.7</b> Relaciones estequiométricas empleadas en la síntesis de ésteres de xilitol y ácido oléico.....	81

## 1 Resumen

En este proyecto se propone la síntesis de ésteres de xilitol y ácido oléico mediante reacciones de hidrólisis inversa catalizada por una lipasa (Novozym 435®) en medio de reacción no convencionales. Estas moléculas debido a su carácter anfifílico, son utilizadas como agentes emulsificantes en la industria alimentaria y farmacéutica principalmente. Mediante estrategias de ingeniería de solventes se logró la manipulación del perfil de productos de las moléculas sintetizadas, de tal forma que la utilización de disolventes polares como 2M2P/DMSO 80:20 (v/v) como medio de reacción se obtuvo la síntesis dirigida de monoésteres con un 73% de selectividad. La utilización de disolventes hidrofóbicos como hexano permite realizar la síntesis altamente selectiva (94%) de diésteres y triésteres de xilitol y ácido oléico.

Finalmente mediante el modelo teórico UNIFAC se realizaron los cálculos de actividades termodinámicas a fin de explicar el comportamiento termodinámico del sistema de reacción. De esta forma se demostró que las actividades termodinámicas controlan el equilibrio de la reacción de acuerdo a las interacciones sustrato-disolvente-producto.

## 2 Introducción

En la actualidad las enzimas, definidas como catalizadores biológicos, juegan un papel importante en diversos procesos a nivel industrial. Gracias a su alta especificidad y la posibilidad de llevar a cabo reacciones a bajas temperaturas, algunos procesos que utilizan catalizadores químicos pueden ser modificados para llevar a cabo reacciones catalizadas por enzimas. Dado que los procesos enzimáticos, a diferencia de los procesos químicos, no requieren de condiciones de reacción tan drásticas, la catálisis enzimática presenta como principal atractivo la posibilidad de una disminución sustancial en los costos de producción. Tradicionalmente, la gran mayoría de los procesos enzimáticos se llevan a cabo en medios acuosos, limitando el uso de las enzimas generalmente solo a procesos hidrolíticos. Sin embargo, a partir de los años setenta se demostró que las enzimas funcionan como catalizadores en medios no acuosos. Uno de los procesos que mas impacto han tenido en la catálisis enzimática en este tipo de medios de reacción hidrofóbicos son las reacciones de hidrólisis inversa. El principio general de este tipo de procesos consiste en enfrentar enzimas hidrolíticas tales como las lipasas y las proteasas a medios de reacción prácticamente anhidros. Estas condiciones permiten a las enzimas favorecer la reacción de síntesis de ésteres o amidas sobre las reacciones de hidrólisis correspondientes.

La síntesis enzimática en medio no-acuosos, se ha enfocado en general a la síntesis de nuevos productos difícilmente sintetizados en medios acuosos. Tal es el caso de los ésteres de polioles, los cuales tradicionalmente se producen mediante catálisis química, presentando como principales inconvenientes los bajos rendimientos, la baja selectividad, las altas temperaturas de reacción y la obtención de mezclas de productos difícilmente separables.

Los ésteres de polioles son utilizados principalmente en la industria alimentaria como agentes emulsificantes, como aditivos o en la formulación de productos alimenticios. Sin embargo, a pesar de su gran potencial de aplicación como emulsificantes no iónicos, en las industrias alimentaria,

farmacéutica y cosmetológica, pocos procesos de síntesis industrial han sido reportados. Esto ha provocado la poca variedad de productos comerciales, limitandose en su mayoría a ésteres de glicerol y sorbitol.

En la actualidad el interés por el desarrollo de procesos enzimáticos para la síntesis de nuevos productos emulsificantes reside por un lado, en la necesidad de encontrar nuevas tecnologías consideradas limpias y ecológicamente mas amigables. Por otro lado, existe un interés creciente en el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento razonable de recursos renovables. Finalmente, pero no menos importante, la búsqueda de alternativas que permitan el desarrollo de procesos industriales mas económicos sigue siendo un parámetro determinante en el desarrollo de nuevos procesos.

Dentro del grupo de Ingeniería Enzimática del Instituto de Biotecnología, donde se desarrolló este proyecto, se han propuesto reacciones enzimáticas de hidrólisis inversa catalizadas por lipasas para diferentes sustratos. Esto ha formulado un creciente interés por la producción de moléculas con estas características a partir de diversas materias primas.

Dentro de este contexto, este proyecto se enfocó al estudio de la esterificación de xilitol con ácido oléico. El uso del xilitol resultaría interesante dado su gran potencial biotecnológico y su creciente disponibilidad comercial. Por otra parte, el ácido oléico es un ácido graso natural encontrado en la gran mayoría de los aceites vegetales como el de oliva, macadamia, almendra, girasol y colza. Ambos sustratos considerados como recursos naturales renovables.

Nuestros esfuerzos estuvieron orientados primordialmente al estudio de la factibilidad de llevar a cabo una reacción de síntesis enzimática en medios no acuosos involucrando a la vez sustratos hidrofílicos (xilitol) e hidrofóbicos (ácido oléico).

En efecto, es interesante constatar que a pesar de los grandes avances que el conocimiento de la enzimología en disolventes no convencionales ha experimentado en la última década, la puesta en operación de sistemas de

reacción implicando sustratos polares en medios de reacción hidrofóbicos continúa siendo muy limitado.

Este proyecto también se enfocó en el estudio de las variables del proceso que nos permitan establecer el control adecuado de la reacción. Esto tuvo como principal objetivo, el control del tipo de productos sintetizados en términos del número de grupos esterificados (grado de esterificación). En resumen, este control se orientó al cumplimiento del objetivo global que fué la síntesis enzimática dirigida de agentes emulsificantes con un grado de esterificación específico.

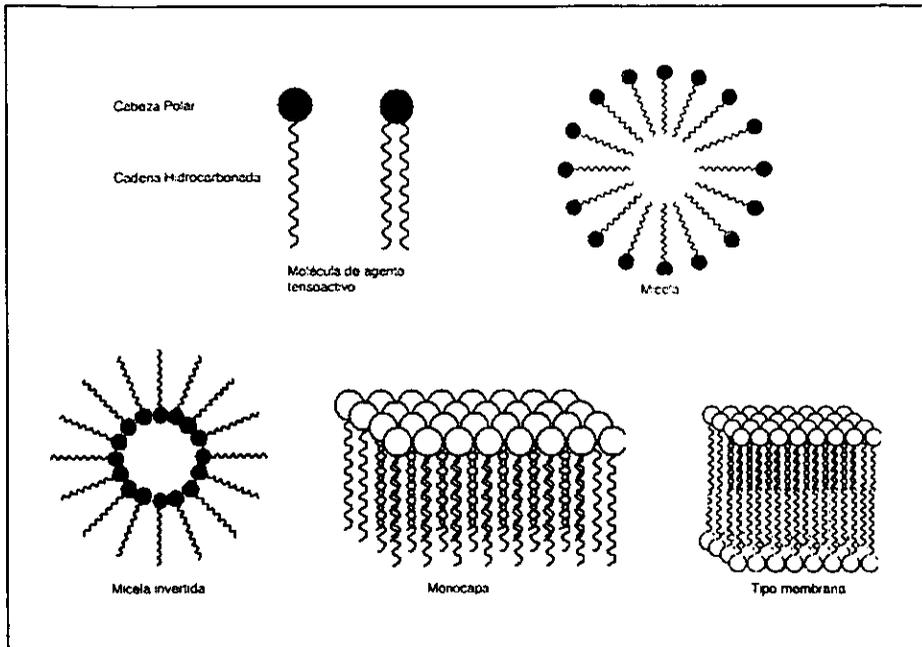
## 3 Antecedentes

### **3.1 Generalidades sobre los Sistemas de Emulsión**

Las emulsiones pueden ser consideradas como una dispersión coloidal, formada por un líquido disperso en una fase líquida continua de diferente composición. Desde un punto de vista fisicoquímico, estas dispersiones se consideran como un sistema termodinámicamente inestable, formado por dos fases líquidas muy poco miscibles o inmiscibles. De manera general se considera que el estado de equilibrio termodinámico más estable será la separación de fases por una interfase plana y que un sistema constituido por dos fases inmiscibles tenderá espontáneamente a este equilibrio desfavorable a la interacción de las dos fases en cuestión.

En un sistema de dos fases líquido-líquido, es frecuente observar que las interacciones que existen en la interfase pueden ser suficientes para crear un desequilibrio en el sistema. Esta modificación del equilibrio trae como consecuencia un reacomodo de las moléculas que actúan sobre la interfase. La forma en que se reacomodan estará en función de las moléculas que constituyen la interfase así como de sus propiedades estructurales.

Un agente emulsificante o tensoactivo presenta como característica principal el poder adsorberse a bajas concentraciones en la interfase o superficie de un sistema constituido por dos fases inmiscibles dando como resultado la disminución de la tensión superficial (Ducret et al 1996). Dependiendo del reacomodo espacial que tomen las moléculas de los agentes tensoactivos en la interfase, se formarán diferentes tipos de emulsiones caracterizadas por las diferentes formas geométricas adoptadas. En la figura 2.1 se muestran algunos tipos generales de emulsiones formados.



**Figura 2.1** Tipos de emulsiones y forma en que se establece las separaciones de fases.

En la práctica común se pueden distinguir dos tipos básicos de emulsiones y estas son principalmente determinadas o definidas por la distribución de las fases en el sistema.

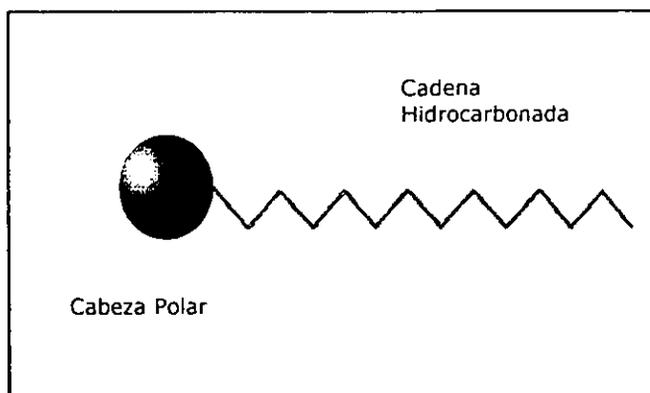
- a) Emulsiones agua en aceite; \* formadas por una fase hidrofílica discontinua contenida en una fase hidrofóbica continua y
- b) Emulsiones aceite en agua; formadas por una fase hidrofóbica discontinua contenida en una fase hidrofílica continua.

---

\* El término aceite es utilizado para generalizar la insolubilidad en agua.

### 3.1.1 Estructura de Tensoactivos

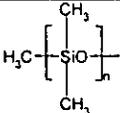
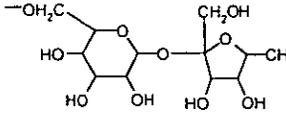
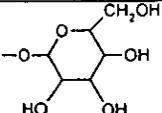
La estructura química de los tensoactivos está constituida básicamente por dos grupos: una cabeza polar o hidrofílica y un extremo hidrofóbico, tal como se presenta en la figura 2.2.



**Figura 2.2** Representación esquemática de la estructura de un tensoactivo.

La presencia de estos grupos en una sola molécula les confiere la característica principal de ser anfifílicos y poder interactuar tanto con fases hidrofóbicas como con fases hidrofílicas. El carácter de tensoactivos que poseen los agentes emulsificantes está determinado por la naturaleza química de los dos grupos presentes en la molécula, característica que les permite modificar la tensión superficial de las fases con las cuales interactúan. Existen una gran variedad de grupos químicos que son utilizados para la producción de agentes tensoactivos, esto les permite una gran versatilidad y adaptabilidad a un gran número de aplicaciones específicas. En la tabla 2.1 se presentan algunos ejemplos de la variedad de grupos que son utilizados para la síntesis de agentes tensoactivos.

**Tabla 2.1** Grupos polares e hidrofóbicos mas comunes utilizados para la producción de tensoactivos.

Grupos Hidrofóbicos		Grupos Hidrofilicos	
Cadenas Alifáticas	$C_nH_{2n+1}-$	$-COO^{\cdot}K^+$	Sales de ac. Carboxílico
Cadenas Alifáticas Insaturadas	$C_nH_{2n-1}-$	$-SO_3^{\cdot}Na^+$	Sales de ac. Sulfónico
Alquilfenoles	$C_nH_{2n+1}-C_6H_4-$	$-PO_3^{2-}2Na^+$	Sales de ac. Fosfónico
Dimetil polidioxisilano (silicon)			Carbohidratos
			Poliol
		$-CON[(OCH_2CH_2O)_nOH]_2$	Amida polietoxilada

Los surfactantes que actúan preferencialmente en fases acuosas son generalmente clasificados en función de su contenido en grupos hidrofílicos (Ullmanns 1995). Los grupos hidrofílicos pueden ser iónicos o no iónicos y sus estructuras químicas pueden ser muy variadas. De acuerdo a este criterio pueden ser clasificados como aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóteros. En la tabla 2.2 se muestra la clasificación de los surfactantes en función de la carga que poseen.

**Tabla 2.2** Clasificación de tensoactivos de acuerdo a la naturaleza de los grupos polares presentes en la molécula.

Clasificación	Ejemplos	Estructura
Aniónicos	Estearato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-\text{Na}^+$
	Dodecil sulfato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Dodecil bencensulfonato de sodio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
Catiónicos	Cloruro de laurilamonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$
	Cetiltrimetilbromuro de amonio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
No-iónicos	Alcohol polietoxilado	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$
	Alquilfenol polietoxilado	$\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$
	Esteres de glicerol	$\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$
Amfóteros	Lauramidopropil betaina	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
	Cocoamido-2-hidroxiopropil	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
	Sulfobetaina	

Cabe mencionar que los surfactantes no-iónicos presentan un gran interés desde un punto de vista de su aplicación en productos destinados al consumo humano. Esto se debe principalmente a su estructura química, a su baja reactividad, y a su alta compatibilidad con ciertos grupos radicales. Además en general son menos tóxicos, pues no presentan cargas iónicas, evitando riesgos de irritabilidad en productos farmacéuticos y cosmetológicos (Cserhádi & Forgács 1997).

### 3.1.2 Balance Hidrofílico-Lipofílico (BHL)

La forma mas recurrida para caracterizar a los agentes tensoactivos es mediante el balance hidrofílico lipofílico (BHL), introducido por Griffin en 1949. Esta caracterización se fundamenta en el estudio cuantitativo de la solubilidad de agentes tensoactivos en agua y en la asociación de estos valores a una escala arbitraria que sugiere la aplicación que se les puede dar. De manera general, el BHL de un agente emulsificante determina el tipo de emulsión que puede formarse, funcionando solamente como un indicador del comportamiento físico del sistema y no como una medida del pseudo-equilibrio generado. Los valores de BHL oscilan entre 1 y 20, siendo que un

agente emulsificante con valores de BHL entre 3 y 6 promoverá o permitirá preferencialmente la formación de emulsiones agua en aceite y valores entre 8 y 13 emulsiones aceite en agua. Los valores extremos e intermedios estarán asociados a aplicaciones específicas o a sistemas intermedios. En la tabla 2.3 se muestran algunas aplicaciones de tensoactivos de acuerdo al tipo de emulsión que forman y al BHL que les corresponde.

**Tabla 2.3** Aplicaciones de agentes tensoactivos de acuerdo a su valor de BHL.

BHL	Comportamiento en agua	Principales Aplicaciones
0-3	Insolubles	Antiespumantes y coemulsificantes.
3-6	Insolubles y dispersos	Emulsiones agua en aceite y coemulsificantes.
6-8	Dispersos dando una solución lechosa	Espumantes y emulsiones agua en aceite.
8-10	Solubles dando soluciones turbias a translúcidas	Espumantes.
10-13	Solubles dando soluciones translúcidas a claras	Emulsiones aceite en agua, detergentes y agentes limpiadores.
13-15	Solubles dando soluciones claras	Emulsiones aceite en agua, detergentes y agentes limpiadores.
> 15	Solubles dando soluciones transparentes	Solubilizantes y agentes limpiadores

Es importante mencionar que los emulsificantes disponibles a nivel comercial rara vez son compuestos puros, por lo general son mezclas de tensoactivos con diferentes grados de esterificación (grado de esterificación se refiere al número de enlaces éster en la molécula, de tal forma que un monoéster tiene un grado de esterificación igual a 1, un diéster un grado de esterificación igual a 2 y así sucesivamente). Esto es debido a que el proceso de síntesis de los emulsificantes generalmente está asociado a la formación de subproductos siendo estos muy difíciles de separar. En la tabla 2.4 y 2.5 se presentan algunos valores de BHL de tensoactivos puros y sus equivalentes comerciales.

**Tabla 2.4** Emulsificantes comerciales, su composición y valor de BHL.

Nombre Comercial	Componente Principal	BHL
Atmos 150	Mono- y diglicéridos	3.2
Tween 20	Polioxiétilen monolaurato de sorbitan (Polisorbato 20)	16.7
Tween 60	Polioxiétilen monoestearato de sorbitan (Polisorbato 60)	14.9
Tandem 8	Mono- y diglicéridos y Polisorbato 60	8.1
Tandem 552	Mono- y diglicéridos, Polisorbato 60 y Agua	8.1
MYRJ 52	Polioxilestearato	16.9

**Tabla 2.5** Valores de BHL para algunos emulsificantes puros.

Emulsificante	BHL
Trioleato de Glicerol	0.8
Dioleato de Glicerol	1.5
Monooleato de Glicerol	2.7
Monoestearato de Glicerol	3.8
Poliésteres de Sacarosa	3.5
Monooleato de Sorbitán (span 80)	4.3
Monoestearato de Sorbitán (span 60)	4.7
Monopalmitato de Sorbitán	6.7
Monolaurato de Sorbitán	8.6

Como ya se ha mencionado, los valores de BHL son función del tipo de estructura de los agentes tensoactivos, es decir, dependiendo de la hidrofiliicidad del grupo polar y de la hidrofobicidad de la cadena hidrocarbonada un valor de BHL es asignado. En el caso de los emulsificantes no-iónicos, la estructura del grupo polar al estar constituido generalmente por uno o varios grupos hidroxilo confiere a la molécula una mayor versatilidad en términos de los valores de BHL que les pueden ser asignados. Por otro lado, la longitud y el número de las cadenas hidrocarbonadas dentro de la misma molécula participan directamente en estos valores de BHL. En la tabla 2.6 se muestra la diferencia que existe en los valores de BHL para los diferentes ésteres de sorbitán, cuya parte polar

está constituida por cuatro grupos hidroxilo pero la cadena hidrocarbonada varía en numeros de carbono.

**Tabla 2.6** Valores de BHL de ésteres de sorbitán.

Agente Tensoactivo	Nombre	BHL
Span 20	Monolaurato de Sorbitán (C <sub>12</sub> )	8.6
Span 40	Monopalmitato de Sorbitán (C <sub>16</sub> )	6.7
Span 60	Monostearato de Sorbitán (C <sub>18</sub> )	4.7
Span 80	Monooleato de Sorbitán (C <sub>18:1</sub> )	4.3

### **3.2 Propiedades y Aplicaciones de Ésteres de Polioles**

Como se ha mencionado en párrafos anteriores los ésteres de polioles, utilizados como agentes emulsificantes, presentan un gran potencial para aplicaciones en diversos sectores productivos de la industria alimentaria y farmacéutica gracias a sus muy particulares propiedades estructurales. Estas moléculas tienen la característica particular de presentar una baja toxicidad, de ser biodegradables y de obtenerse a partir de recursos renovables. El carácter anfifílico de los agentes emulsificantes propone estructuras diversas para su aplicación como tensoactivos no-iónicos. La aplicación de estos productos será determinada por la naturaleza de los sustratos, básicamente del poliol y del ácido graso que se utilice. En otras palabras, pese a que existe una gran variedad de polioles que pueden ser utilizados para la formación de moléculas anfifílicas, no todos representan una alternativa comercial viable para la producción de emulsificantes. Por ejemplo, los de mayor interés para la industria alimentaria son aquellos que de cierta forma ya son utilizados en nuestro organismo, o que pueden ser metabolizados. Dentro de este grupo de mayor interés podríamos citar a los carbohidratos, el glicerol, y otros compuestos cuyas características físicas y químicas son muy parecidas a las de los carbohidratos, tales como el xilitol y el sorbitol. Todas estas moléculas presentan además la ventaja de ser productos renovables.

Dentro de las aplicaciones, otras que solo agentes emulsificantes, se sabe además que los ésteres de xilitol son utilizados como acarreadores de oxígeno en el torrente sanguíneo (Zarif et al 1990) y como medicamentos para el tratamiento del cáncer y pacientes relacionados con hemoglobinopatías (Pouillart et al 1998). Los ésteres de sacarosa son utilizados para la inhibición del crecimiento de bacterias (Hathcox & Beuchat 1996, Monk et al 1996). Los ésteres de disacáridos han mostrado aplicaciones como antitumorígenos (Woudenberg-van Oosterom et al 1996). En general, los ésteres de polioles han encontrado también una gran aplicación en la industria alimentaria. Esto, por un lado se debe a sus buenas propiedades como emulsificantes y a que además han sido aceptados para su uso en alimentos. En los últimos años, estos productos han sido ampliamente utilizados como sustitutos de grasas en productos a base de lípidos (Maag 1984, Akoh & Nwosu 1992) además como emulsificantes en la preparación de productos alimenticios (Maag 1984, Ward et al 1997). Los ésteres de glicerol son utilizados también como agentes texturizantes (Castillo et al 1997) y como complementos alimenticios en infantes (Schmid et al 1998). En la industria cosmetológica son utilizados como emulsificantes para la preparación de productos dermocosmetológicos (Bousquet et al 1999, Thevenin et al 1996). En la industria agrícola los ésteres de sacarosa son utilizados para prevenir la infección de plantas de tabaco por áfidos o pulgas (Xia et al 1997b, Xia & Johnson 1997a), para la germinación de semillas y como fertilizantes para el cultivo de varias plantas (Peterson et al 1997). En conclusión, los ésteres de polioles o carbohidratos constituyen un grupo muy importante de tensoactivos no-iónicos con aplicaciones potencialmente importantes en muchas industrias (Lortie 1997). Es a raíz de este gran potencial de aplicación que el interés por el desarrollo de procesos eficientes de síntesis de éstas moléculas se ha incrementado tanto en la última década.

### **3.3 Síntesis Química de Ésteres de Polioles**

Los métodos mas utilizados para la síntesis de ésteres de polioles a escala industrial son por lo general métodos químicos. Dentro de estos métodos, uno de los parámetros que determinan la elección del proceso es la naturaleza de los sustratos. Un procedimiento común en muchos métodos es la esterificación directa de los polioles con los ácidos grasos (Akoh 1995, Mattson & Volpenhein 1962). Por lo general las reacciones esterificación directa se llevan a cabo a altas temperaturas (200-250 °C) y altas presiones (5-10 atm) y son efectuadas en disolventes orgánicos polares como dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) debido a la baja solubilidad que presentan los polioles en otro tipo de disolventes (Arcos et al 1998a). Los principales inconvenientes que presentan estos procedimientos son la formación de subproductos de oxidación, el bajo rendimiento (35-50%) y un alto grado de isomerización en la mezcla de reacción. Como consecuencia a las condiciones de reacción tan drásticas y a la presencia de contaminantes, la síntesis de ésteres de polioles mediante esterificación directa ha recibido poca aceptación en la industria alimentaria y cosmetológica (Cao et al 1999).

Otro procedimiento común para la síntesis de ésteres de polioles es mediante reacciones de hidrólisis parcial de triglicéridos para la formación de moléculas estructuralmente más sencillas. Este procedimiento es muy poco utilizado debido a la obtención de una gran cantidad de subproductos, al bajo rendimiento hacia los productos de interés y la poca variedad de sustratos disponibles (triglicéridos). Por lo general las reacciones de hidrólisis se llevan a cabo en medios acuosos mediante catálisis ácida a temperaturas de 200 a 250 °C y presiones de 10 atm lo cual provoca la descomposición de algunos subproductos y la coloración no deseada de la mezcla de reacción. Las reacciones de hidrólisis parcial de triglicéridos son preferentemente utilizadas para la producción de ácidos grasos libres (Gandhi 1997).

El proceso industrial mas utilizado para la producción de ésteres de polioles es la reacción de alcoholisis, en la cual se hacen reaccionar mono-alcoholes o polialcoholes con diferentes triglicéridos o acil-ésteres de ácidos grasos (p.e.

metil-oleato). Los acil-ésteres resultan ser buenos grupos reactivos ya que en general los grupos metil-, etil-, etc. tienen la característica de ser buenos grupos salientes favoreciendo la formación del radical del ácido graso libre el cual reacciona en una segunda etapa con el alcohol para la formación de los diferentes monoésteres y diésteres (Osipow et al 1956, Osipow et al 1966). En los procesos de alcoholólisis se utilizan catalizadores inorgánicos y temperaturas superiores a los 150 °C para llevar a cabo las reacciones y debido a las condiciones de reacción es difícil controlar el grado de esterificación de la mezcla final. La alcoholólisis fué reportada como uno de los primeros intentos para la formación de ésteres de polioles (Osipow et al 1956). Bajo estas condiciones de reacción el uso de los productos finales estaba limitado solo a ciertas aplicaciones debido a la gran cantidad de subproductos, en algunos casos tóxicos. Además, por supuesto, del uso de disolventes no apropiados para la producción de aditivos alimenticios como DMSO y DMF.

En resumen, las principales ventajas y desventajas de los principales métodos de síntesis química se presentan en la tabla 2.7.

**Tabla 2.7** Ventajas y desventajas de la síntesis química de ésteres de polioles.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos volúmenes de producción</li> <li>• Tiempos cortos de reacción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja selectividad</li> <li>• Diferentes grados de esterificación en la mezcla final de productos (Bell et al 1995)</li> <li>• Altas temperaturas</li> <li>• Caramelización y/o deshidratación de productos a altas temperaturas (Arcos et al 1998a)</li> <li>• Difícil separación de sustrato y subproductos en la mezcla final mediante destilación</li> <li>• Alto consumo energético</li> <li>• El uso de catalizadores inorgánicos o metálicos que requiere de procesos adicionales para la inactivación o en el mejor de los casos su separación para poder ser reutilizados.</li> <li>• Procesos posteriores de purificación para la obtención de producto puro (destilación molecular)</li> </ul>

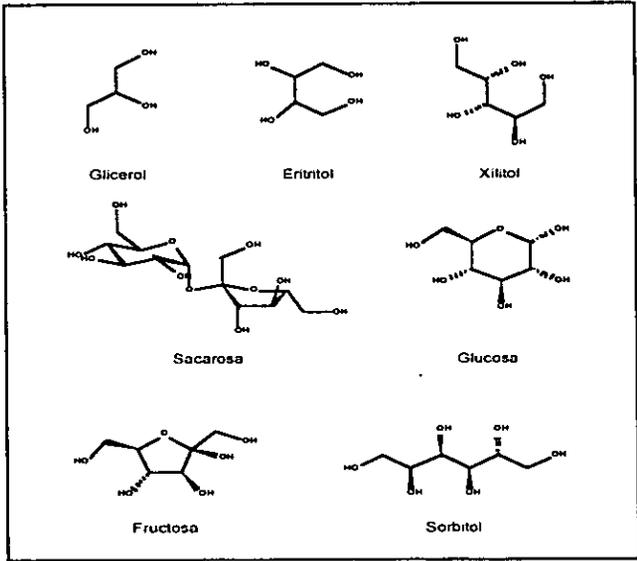
La baja selectividad de la síntesis química de ésteres de polioles requiere de etapas de recuperación posteriores para la obtención del producto deseado en altas concentraciones. Para esto se llevan a cabo procesos de purificación altamente costosos y con altos consumos energéticos. El proceso más utilizado para su purificación es mediante destilación molecular (Akoh 1995, Gandhi 1997, Ullmanns 1995, Gunstone 1998).

### **3.4 Biosurfactantes**

En la actualidad existe un gran interés por productos "ambientalmente amigables", es decir, productos que no dañen al medio ambiente. Esto ha generado un creciente interés en el estudio y la investigación para la obtención de surfactantes no tóxicos, biodegradables y de bajo impacto para el medio ambiente. Los agentes emulsificantes de mayor interés en la actualidad son los llamados biosurfactantes debido a que son hechos a base de materia prima renovable, de bajo costo y de fácil obtención (Ducret et al 1996). Tradicionalmente se consideraba como biosurfactantes solo a aquellos producidos por células vivas, por lo general, microorganismos (Fiechter 1992). Sin embargo en la actualidad se conoce con este término a todas aquellas moléculas que pueden ser degradadas por organismos vivos. En esta categoría de agentes tensoactivos se incluyen entonces moléculas secretadas por células o sintetizadas a través de bioprocesos. A diferencia de los surfactantes convencionales, los biosurfactantes están hechos a base de materias primas renovables tales como los carbohidratos o polioles y ácidos grasos. Es necesario aclarar que no todas estas moléculas deben ser consideradas como biosurfactantes pues se sabe que algunos ésteres de carbohidratos pueden llegar a tener estructuras muy complejas que no necesariamente son fácilmente biodegradables (Akoh 1995). Un ejemplo muy ilustrativo sería el producto comercial conocido como Olestra, un sustituto de grasas producido por Procter & Gamble cuyo componente principal es un poliéster de sacarosa con 6-8 grupos acilo por unidad de sacarosa (Gunstone 1998). El Olestra al no ser metabolizado en el tracto

digestivo por los complejos enzimáticos, es directamente excretado por el organismo. Esta característica le confiere la propiedad de tener un valor calórico muy cercano a cero.

El interés por moléculas menos complejas, de carbohidratos u otros polioles, que tengan gran versatilidad como agentes tensoactivos ha ido en aumento en los últimos años. Tal es el caso de los ésteres de polioles como el xilitol cuya estructura es muy parecida a la de los ésteres de glicerol o sorbitol, productos comercialmente disponibles. Estas moléculas debido al contenido de varios grupos hidroxilo pueden tener diferentes valores asignados de BHL mediante la manipulación del número de radicales hidroxilo libres y del número de cadenas hidrofóbicas que tengan unidas. En la figura 2.3 se muestran algunos polioles que son utilizados actualmente para la producción de emulsificantes como es el caso del glicerol, la sacarosa y el sorbitol y polioles como el xilitol y el eritritol con perspectivas interesantes en su aplicación como tensoactivos.



**Figura 2.3** Representación esquemática de las diferentes estructuras de algunos polioles.

### **3.5 Reacciones de Síntesis Enzimática en Medios No-Convencionales**

La mayoría de los procesos catalizados por enzimas son realizados en medios acuosos debido a que las enzimas provienen de organismos cuyo ambiente vital es el agua. A partir de los años setenta se reportan los primeros intentos por demostrar que las enzimas de ciertos organismos pueden funcionar como catalizadores en medios no acuosos. Desde entonces se han intensificado las labores de investigación para la aplicación de procesos enzimáticos en medios no acuosos o hidrofóbicos. Uno de los primeros grupos en estudiar el comportamiento de las enzimas en medios no acuosos fue el equipo de Klibanov y colaboradores (Klibanov 1986), quienes mostraron la factibilidad y las ventajas que tiene el trabajar reacciones enzimáticas en medios no acuosos. Entre ellas destacan la facilidad de recuperación de la enzima debido a su insolubilización en medios no acuosos, la posibilidad de aumentar la estabilidad operacional, sobre todo la posibilidad de catalizar nuevas reacciones de síntesis y el aumento en la eficiencia de conversión de sustratos hidrofóbicos debido a la alta solubilidad que presentan los sustratos comparado con medios de reacción acuosos (Adlercreutz 1994).

#### **3.5.1 Reacciones de Hidrólisis Inversa**

Entre la gran variedad de enzimas disponibles en la naturaleza, algunas enzimas como la esterasas, las proteasas y las lipasas cuando son confrontadas a ciertas condiciones de reacción son capaces de llevar a cabo reacciones de hidrólisis inversa en disolventes orgánicos (Dordick 1989, Jaeger & Riva 1998, Riva & Secundo 1990, Vulfson 1993). Dicho en otras palabras, en medios de reacción con bajo contenido de agua se observa que estas hidrolasas muestran una marcada preferencia por las reacciones de síntesis sobre la reacción "natural" de hidrólisis. Mediante la hidrólisis enzimática inversa una gran variedad de reacciones de síntesis se pueden llevar a cabo por la simple modificación de las condiciones de equilibrio de la reacción. De acuerdo con la literatura, el grupo de enzimas con mayor capacidad para llevar a cabo reacciones de esterificación en medios no-

convencionales son las lipasas (E.C. 3.1.1.3) (Chand et al 1997, Klivanov et al 1977, Bell et al 1995, Vija et al 1997, Yahya et al 1998). No obstante existen otras enzimas capaces de efectuar este tipo de reacciones. En la tabla 2.8 se presentan algunos trabajos que se han efectuado en este sentido.

**Tabla 2.8** Ejemplos de reacciones de esterificación en medios no-convencionales.

Sustrato	Sustrato	Producto	Medio Reacción	Enzima	Ref
Isoamil alcohol	Acetato de Amonio	Isoamil acetato	Hexano	Lipozyme	Vija (1998)
Ibuprofeno	Decanol, Dodecanol	Decanoato, dodecanoato de ibuprofeno	s/disolvente	Novozym 435	Pepin (1999)
Colesterol	Acetato de Vinilo	Acetato de Colesterol	Hexano	Candida rugosa tipo VII	Sarkari (1999)
Eritritol	Acido Láurico	Laurato de Eritritol	Acetonitrilo	Novozym 435	Adachi (1999)
Metanol Etanol n-Propanol n-Butanol	Acido Lipoico	Lipoato de Metanol, Etanol, n-Propanol, n-butanol	Hexano	Candida rugosa	Fadnavis (1997)
Glucosa	Acido Laurico Acido Cáprico	6-O-laurilglucosa 6-O-caprilglucosa	Piridina	Porcine Pancreatic Lipase	Therisod (1986)
Glucosa	C <sub>2</sub> -C <sub>20</sub>	6-O-acil-β-glucosa	2M2B	Novozym 435 Lipozyme	Degn (1999)
n-Butanol	Acido Oléico Acido Eliádico Acido Linoléico Acido Linolénico	Esteres-butilicos	Hexano	Chirazyme L-5 Candida antarctica Candida cylindracea Mucor Miehei	Warwel (1999)
5-Hidroxil Ribonucleotidos	Trifluoroetilbutirato	Butiril-ribonucleosidos	Piridina	Subtilisin	Singh (1994)
N-Ac-L-Ser-OEt (Ser) N-Ac-L-Phe-OEt (Phe)	1-Propanol	N-Ac-L-Ser-OPr (Ser) N-Ac-L-Phe-OPr (Phe)	Benceno 2M2B Diclorometano	Subtilisin Carlsberg	Westcott (1993)
Disacaridos	Tricloroetilbutirato	Butiril-disacaridos	DMSO	Subtilisin	Riva (1988)

El principio general por el cual las reacciones enzimáticas de hidrólisis inversa pueden llevarse a cabo en medios no acuosos es que gracias al bajo contenido de agua en el sistema, existe la posibilidad de desplazar el

equilibrio termodinámico de una reacción de hidrólisis en el sentido preferencial de la síntesis (Dordick 1989, Lortie 1997, Mensah et al 1998, Sarkari et al 1999). Así, en el caso de una esterasa o una lipasa, el esquema de reacción para las reacciones de hidrólisis inversa puede ser representado por la ec. 1:



y representando la ecuación de equilibrio para la reacción de síntesis:

$$K_{EQ} = \frac{[\text{Ester}] * [\text{Agua}]}{[\text{Alcohol}] * [\text{Ac.Graso}]}$$

ec. 2

Si consideramos condiciones iniciales de reacción en las cuales se tiene el alcohol y el ácido graso y baja concentración de agua, entonces el equilibrio termodinámico favorece la formación del éster y el agua correspondientes hasta alcanzar la posición del equilibrio determinado por la termodinámica del sistema.

Una de las razones por las que se suponía que las enzimas solo presentaban una actividad de hidrólisis es porque se considera que su medio natural de reacción es el agua. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente que al utilizar disolventes orgánicos como medio de reacción, la concentración de agua puede ser suficientemente baja para permitir que la reacción enzimática de hidrólisis se invierta hacia la formación del éster (Klibanov et al 1977).

Las ecuaciones de equilibrio de los sistemas de reacción son mejor representadas en función de las actividades termodinámicas (Adlercreutz 1994, Halling 1994), sin embargo son normalmente expresados en función de la concentración debido a que es una propiedad fácilmente medible. La actividad termodinámica al relacionarse con la concentración a través del coeficiente de actividad ( $\gamma_i$ ) en mezclas soluto-disolvente (ec. 3) representa

una forma mas real de expresar la reactividad de las moléculas de sustratos y productos

$$a_i = \gamma_i * x_i \quad \text{ec. 3}$$

$a_i$  = actividad termodinámica

$\gamma_i$  = coeficiente de actividad

$x_i$  = fracción mol

lo cual permite representar la ecuación de equilibrio para las reacciones de síntesis en función de las actividades termodinámicas de la siguiente manera:

$$K_{EQ} = \frac{(a_{\text{ester}} * a_{\text{agua}})}{(a_{\text{poliol}} * a_{\text{ac.graso}})} \quad \text{ec. 4}$$

K = constante de equilibrio

Así entonces, al hablar de actividad termodinámica, en términos de disponibilidad, mientras mas activos, mas disponibles estan los sustratos para llevar a cabo la reacción.

En la producción de ésteres de polioles mediante esterificación directa con ácidos grasos, la cantidad de agua representa un factor determinante en el equilibrio de la reacción ya que ésta es producida durante la reacción, tal como se muestra en la ec. 1. Existen varias razones por las que la cantidad de agua en una reacción enzimática debe de ser controlada. La primera y más evidente es que el agua juega un papel importante en el equilibrio termodinámico de la reacción. La acumulación de agua en el medio de reacción dificulta la formación de más producto, en este caso el éster. Si se procura tener la actividad de agua por debajo de la condición de equilibrio, la reacción de síntesis se ve favorecida y el equilibrio de la reacción será entonces desplazado hacia la formación de ésteres. La condición óptima sería tener un sistema de reacción con una actividad de agua igual a cero. Sin embargo, esta condición puede conllevar problemas de otra índole. El

ejemplo mas claro sería la inactivación de la enzima por la pérdida del agua esencial que le permite conservar su configuración catalíticamente activa (Dordick 1989, Wehtje & Adlercreutz 1997).

En una gran variedad de publicaciones se reporta y aprovecha el control de agua en el medio de reacción para el control de la reversibilidad de la reacción. Cabe mencionar que una baja concentración o actividad de agua en el sistema conlleva a un aumento en la formación de productos de síntesis (Adachi et al 1999, Leitgeb & Knez 1990) pero en un caso extremo también llevaría a una inactivación de la enzima.

El control de agua en el medio de reacción es uno de los factores más importantes que afectan las reacciones enzimáticas de síntesis de ésteres por hidrólisis inversa (Bellot et al 1998, Pepin & Lortie 1999). Existen varios métodos para prevenir o controlar el aumento de la actividad de agua presente en el medio y todos están destinados a mantener la actividad de agua por debajo de las condiciones de equilibrio. Entre los más utilizados están:

1. El uso de tamiz molecular, con capacidad de adsorber el agua presente en el sistema. Se sabe que este tipo de soportes logran adsorber alrededor de 20 % w/w de agua (Ducret et al 1995, Arcos et al 1998d).
2. Los sistemas de reacción a presiones reducidas, los cuales logran evaporar de forma continua el agua producida durante la reacción a temperaturas inferiores a su punto de ebullición (Ergan et al 1990, Coulon et al 1999, Ducret et al 1996).
3. El control de actividad de agua mediante la selección de un par de sales que permita fijar este valor a un nivel específico, propiedad que es función directa de sus estados de hidratación. Esta actividad se mantendrá constante hasta que la sal se sature con agua y modifique su estado de hidratación a un nivel superior (Han et al 1998, Halling 1992).

### 3.5.2 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3)) son enzimas que catalizan la hidrólisis de acilglicéridos. Sin embargo algunos compuestos como ésteres y amidas también son aceptados como sustrato por este grupo de enzimas (Reyes et al 2000). Estas enzimas pueden ser obtenidas de tejido animal o de varios microorganismos (Gandhi 1997). Una de las propiedades mas atractivas de las lipasas es la alta especificidad que presentan. De acuerdo a la especificidad las lipasas pueden ser clasificadas de la siguiente manera (Wong 1995):

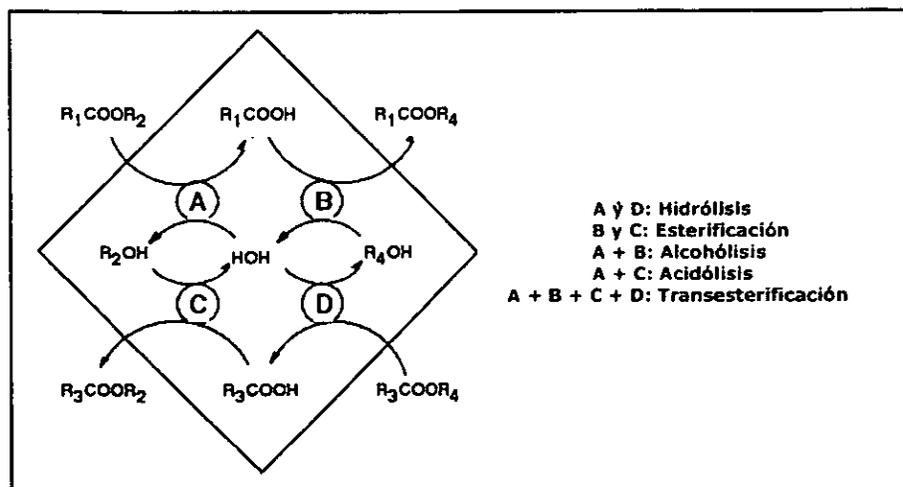
1. Especificidad por Sustrato: Aquellas que presenta especificidad por los triglicéridos o los ésteres de ácidos grasos y alcoholes.
2. Especificidad por la Posición: Algunas lipasas presentan una selectividad por la hidrólisis o síntesis preferencialmente en las posiciones 1,3 del glicerol o de los acilglicéridos.
3. Estereoespecificidad: Las lipasas son capaces de identificar la configuración de los ésteres llevando a cabo reacciones de hidrólisis o síntesis para la resolución de mezclas racémicas.

Las propiedades de las lipasas pueden ser modificadas en función de la naturaleza del medio de reacción debido a que la composición de la mezcla de reacción en el equilibrio termodinámico es función del medio de reacción (Wescott & Klibanov 1994).

La aplicación de estas enzimas aumenta con la capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis inversa bajo ciertas condiciones de reacción (Gandhi 1997, Schmid et al 1999). En la actualidad la aplicación principal de estas enzimas es la modificación de aceites y grasas (Godfrey & West 1996, Gunstone 1999).

### 3.5.3 Reacciones Catalizadas por Lipasas

Las lipasas son capaces de catalizar principalmente dos tipos de reacciones: las de hidrólisis y las de síntesis, en las cuales se incorporan o desincorporan ácidos grasos a alcoholes o polioles como glicerol o carbohidratos. Estos dos tipos de reacciones se pueden subdividir en diversas variantes ejemplificadas en la figura 2.4



**Figura 2.4** Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las lipasas.  $R_i$ : grupo acilo ( $i=1,2,3,4$ ).

Las lipasas presentan una actividad hidrolítica en medios acuosos, mientras que en medios orgánicos (con un bajo contenido de agua) presentan actividad de síntesis. La actividad catalítica de las lipasas depende de la cantidad de agua en la superficie de la enzima, y por lo tanto de la actividad mínima de agua en el sistema de reacción.

Como se presentó en la tabla 2.7 las lipasas son capaces de catalizar reacciones de esterificación de una gran variedad de sustratos. El medio de reacción será determinante para la reversibilidad de la reacción, por eso varias reacciones son efectuadas en disolventes como hexano debido al bajo contenido de agua que este disolvente puede tener.

Las lipasas han probado ser catalizadores efectivos para la producción de ésteres de ácidos grasos mediante reacciones de hidrólisis inversa. Esto requiere del empleo de disolventes orgánicos como medio de reacción, cuyas propiedades están fuertemente relacionadas con la especificidad de las lipasas (Wescott & Klivanov 1994).

### **3.6 Síntesis Enzimática de Esteres de Polioles**

Los principales ésteres de polioles utilizados como emulsificantes no iónicos son los ésteres de glicerol, moléculas que ocupan aproximadamente un 70% del mercado de los emulsificantes (Arcos et al 1998b). Debido a que los tensoactivos comerciales son generalmente mezclas de emulsificantes existe un interés particular por la síntesis selectiva de productos de interés. Se han propuesto diversos mecanismos para llevar a cabo reacciones de síntesis enzimática de ésteres de glicerol: transesterificación, glicerolisis y esterificación directa (Villeneuve et al 1998).

#### **3.6.1 Reacciones de Transesterificación:**

Debido a la hidrofobicidad de los triglicéridos y a su baja solubilidad en medios acuosos o disolventes polares, la transesterificación de triglicéridos ha sido propuesta tanto en medios bifásicos como en disolventes orgánicos no polares. Tweddell et. al. (1998) reportaron la transesterificación de tripalmitina y trioleína en medios de reacción bifásicos para la obtención de triglicéridos estructurados, mientras que Chandler et. al. (1998) utilizan diferentes disolventes orgánicos para su obtención a partir de reacciones de transesterificación. Schmid et. al. (1998 y 1999) utilizan disolventes muy hidrofóbicos para lograr una mayor especificidad en la formación de triglicéridos estructurados mediante transesterificación en las posiciones 1,3 de los triglicéridos. Tweddell (1998) utiliza un par de sales para el control de la actividad de agua, mientras que Chandler (1998) y Schmid (1998 y 1999) controlan la actividad de agua mediante la adición de tamiz molecular al medio de reacción. En ambos reportes se obtienen mejores conversiones

(60 y 65 % resp.) en disolventes altamente hidrofóbicos como hexano y manteniendo una actividad baja de agua (0.2 y 0.11 respectivamente) se obtiene una mayor especificidad por las posiciones 1,3 del glicerol.

### **3.6.2 Reacciones de Esterificación Directa**

La formación de triglicéridos mediante reacciones de esterificación directa del glicerol con el ácido graso ha sido tratado por Janssen et. al. para la producción selectiva de mono-, di-, y tridecanoilglicerol catalizado por la lipasa *Chromobacterium viscosum* (Janssen et al 1993). Mediante la correcta selección del medio de reacción los autores fueron capaces de cambiar las proporciones de mono-, di-, y triésteres en el producto final, de manera que la utilización de disolventes mas hidrofóbicos favoreció la formación de tridecanoilglicerol y disolventes mas polares la formación de monodecanoilglicerol. Selmi et. al. (1998) y Villeneuve et. al. (1998) realizaron la esterificación directa de glicerol con ácidos grasos de diferente longitud de cadena ( $C_2$ - $C_{20}$ ) en un medio de reacción sin disolvente para observar el efecto producido por la hidrofobicidad del ácido graso. Conforme aumenta la longitud de la cadena, la hidrofobicidad aumenta y debido a la falta de disolvente como medio de reacción la hidrofobicidad del sistema dependió de los componentes. Con el aumento en la longitud de cadena se observa un aumento en la conversión del triglicérido.

Debido a la baja solubilidad que tiene el glicerol en disolventes no polares la utilización de disolventes altamente hidrofóbicos en este tipo de medios de reacción se convierte en un gran problema. Para resolverlo se han propuesto en la literatura diferentes alternativas. Una de ellas es la inmovilización del glicerol en gel de sílica lo que permite lograr mejores conversiones en la síntesis enzimática de ésteres de glicerol y ácido oléico (Castillo et al 1994, Castillo et al 1998, Villeneuve et al 1998, Selmi et al 1998). Con este método se logra también una mayor selectividad de la reacción hacia la producción de 1,3-diacilglicerol o 1-monoacilglicerol. Mediante la adición de un co-solvente polar (2-metil-2-butanol) a la reacción se logró la producción selectiva de monoésteres con una alta selectividad argumentando que esto

es debido principalmente a la disminución en actividad termodinámica de los monoésteres en medios de reacción mas polares.

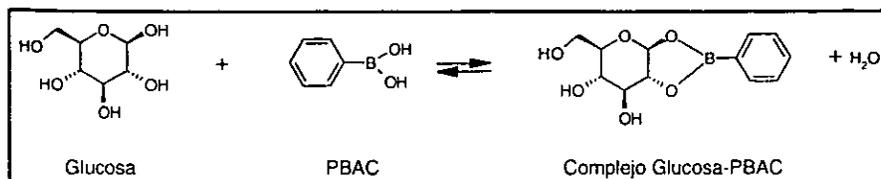
La síntesis enzimática de ésteres de carbohidratos fue reportada por primera vez por Seino et al. (1984) utilizando diferentes lipasas microbianas en un medio de reacción acuoso. Seino et al. proponen la esterificación de sacarosa, fructosa, glucosa y sorbitol con ácido oléico para su aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmetológica. Sin embargo este método presentó las siguientes complicaciones:

1. la conversión fué muy baja.
2. la obtención de una mezcla de productos finales que dificultó la purificación de los productos de mayor interés.
3. la utilización de medios acuosos hace que los procesos de purificación sean mas laboriosos.

A partir de las investigaciones realizadas por este autor, una gran variedad de proyectos se han enfocado en la esterificación de ésteres de carbohidratos mediante métodos más productivos. Sin embargo, la producción de ésteres de carbohidratos mediante síntesis enzimática en medios orgánicos no ha sido del toda exitosa debido principalmente a tres causas:

- la baja solubilidad que presentan los carbohidratos en estos medios de reacción
- baja especificidad en la producción de los productos de mayor interés comercial
- bajos rendimientos de producción.

Teniendo en cuenta esta problemática se han propuesto varias alternativas para la producción de ésteres de carbohidratos. Con el propósito de aumentar la solubilidad de sustratos polares en medios de reacción hidrofóbicos se han realizado reacciones de complejación de la molécula del carbohidrato con ácido fenilborónico (PBAC por su siglas en inglés). El PBAC reacciona generalmente con los grupos hidroxilo presentes en carbonos vecinos formando un complejo tal como se muestra en la figura 2.5.



**Figura 2.5** Reacción de formación del complejo de PBAC (ácido fenilborónico) con glucosa.

Además, de la posibilidad de aumentar la solubilidad de la molécula de poliol en medios hidrofóbicos por la presencia del grupo fenilo, gracias a la protección de los grupos OH por complejación, existe la posibilidad de obtener una mayor probabilidad de hacer reaccionar los radicales no protegidos. Esta técnica ha sido utilizada para la protección de grupos hidroxilo en la esterificación de glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa en 2-metil 2-butanol con la enzima *Pseudomonas* sp. reportándose conversiones de 80%, 63%, 10% y 31% respectivamente (Ikeda & Klivanov 1993). En reacciones sin la formación del complejo no se observa la producción de ésteres. Castillo et. al. (1994) realizaron la síntesis de ésteres de glicerol-PBAC y fructosa-PBAC utilizando como medio de reacción fluidos supercríticos y la enzima Lipozyme® logrando conversiones mayores a 70% y 30% respectivamente.

Otro método reportado para mejorar la solubilidad de carbohidratos en disolventes orgánicos es mediante la adición de un cosolvente polar al medio de reacción. El cosolvente es añadido al medio de reacción para lograr una mayor solubilidad de los carbohidratos. Un cosolvente frecuentemente empleado en la mayoría de los trabajos reportados es dimetilsulfóxido (DMSO). Ferrer et al. (1999) y Villeneuve et al. (1998) utilizan un 20% de DMSO en el medio de reacción para aumentar la selectividad en la formación de monolaurato de sacarosa. La adición de un cosolvente polar al medio de reacción también ha sido tratado por Mohapatra et al. (1999), quienes reportaron que mediante la adición de un 10% de 2-metil 2-butanol en el medio de reacción se obtiene una mayor producción de ésteres.

Un problema común en la síntesis de ésteres de carbohidratos es la baja selectividad por los productos de mayor interés. Se sabe actualmente en el área de biocatálisis que el medio puede modificar el equilibrio termodinámico de la reacción, y como consecuencia las proporciones relativas de los productos finales e intermediarios. Therisod y Klibanov (1986) fueron algunos de los primeros en reportar la utilización de disolventes orgánicos para la producción de ésteres de sacarosa. Utilizaron disolventes como piridina, cloruro de metilo y tetrahidrofurano. El grupo de Akoh propone la utilización de medios de reacción como cloroformo, iso octano o benceno (Akoh 1994) y medios bifásicos (benceno/piridina) para la producción selectiva de diversos ésteres de glucosa y glucósidos (Akoh & Mutua 1994). Fregapane et al. (1994) en cambio proponen un medio de reacción sin disolvente, obteniendo muy buenas conversiones para los ésteres de galactosa y xilosa (>80%).

Ducret et. al (1995 y 1996) proponen la utilización de alcoholes terciarios como medio de reacción para lograr un aumento en la conversión de glucosa, fructosa, sorbitol y xilitol. Las razones principales para el uso de este tipo de alcoholes son su baja reactividad y su contribución a la solubilidad de los sustratos polares sin disminuir la del ácido graso (Bousquet et al 1999). A diferencia de lo propuesto por este grupo, Tsitsimpikou et al. (1997) proponen la síntesis de ésteres de glucosa, manosa y fructosa pero en un medio mucho mas hidrofóbico, hexano, obteniendo una mayor conversión del sustrato, pero una menor selectividad de la reacción hacia la producción de monoésteres. Esto autores argumentan que la hidrofobicidad del medio de reacción mantiene alta la actividad de productos no tan hidrofóbicos como los monoesteres haciendolos muy susceptibles a reaccionar.

Diferentes grupos proponen la utilización de acetona como medio de reacción, debido a que su hidrofobicidad permite mantener baja la actividad de los productos de reacción y a que su uso es aceptado en la preparación de alimentos o aditivos para alimentos (Arcos et al 1998a,b,c,d, Torres et al 1999a,b, Torres et al 2000). En estos trabajos se proponen la producción de ésteres de glucosa, aldosas (galactosa, manosa, sorbitol y fructosa)

utilizando tamiz molecular para mantener concentraciones bajas de agua en el sistema.

Cao et al. (1999) proponen la formación de ésteres de diversos carbohidratos (glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa y sorbitol) en medios de reacción sin disolvente, con la adición de cantidades mínimas de tert-butanol en el medio de reacción para mantener una fase líquida alrededor de la enzima y no disminuir sus propiedades catalíticas. Debido a la ausencia de disolvente, la hidrofobicidad del medio es determinada por los componentes de la reacción, obteniendo conversiones superiores al 60%. Plou et. al. (1999) proponen la utilización de DMSO para la producción selectiva de monolaurato de sacarosa.

En conclusión, los ésteres de polioles pueden ser producidos mediante síntesis enzimática en disolventes orgánicos, representando una nueva gama de productos con potencial de aplicación como emulsificantes en la industria alimentaria y farmacéutica. Estos productos pueden ser obtenidos a partir de recursos renovables, son biodegradables y no tóxicos. Estas perspectivas han generado un interés por la síntesis de nuevos emulsificantes tratando de mejorar sus propiedades como tensoactivos, así como los procesos para su síntesis. Mediante el conocimiento de las propiedades del medio de reacción (estructurales, termodinámicas, etc.) sería posible entonces obtener selectivamente productos con aplicaciones específicas.

### ***3.7 Propiedades Termodinámicas del Medio de Reacción***

Como se mencionó anteriormente, la solubilidad de los sustratos es función de la afinidad por el medio de reacción en el que se encuentran. Esta afinidad es por lo general analizada en función del log P del disolvente, definido como el coeficiente de partición de un compuesto en un sistema bifásico octanol-agua. En la tabla 2.9 se muestran algunos valores para diferentes disolventes orgánicos empleados comunmente para reacciones de hidrólisis inversa.

**Tabla 2.9** Coeficientes de partición octanol/agua (log P) de algunos disolventes orgánicos.

Disolvente	Log P
Dimetilsulfóxido	-1.35
N,N-Dimetilformamida	-1.00
Acetonitrilo	-0.33
Acetona	-0.23
2-Metil-2-Propanol	0.79
2-Metil-2-Butanol	1.30
Cloroformo	2.00
Hexano	3.50

La interacción y afinidad de los sustratos por el solvente puede relacionarse con el log P y con las características estructurales del medio de reacción. Valores elevados de log P corresponden a disolventes hidrofóbicos y valores inferiores a disolventes polares. La síntesis enzimática es preferencialmente reportada en medios de reacción cuyo log P es alto, proporcionando así una mejor solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos. Para la obtención de productos altamente hidrofóbicos como los triglicéridos se ha propuesto la utilización de hexano como medio de reacción para obtener una alta productividad (Schmid et al 1998).

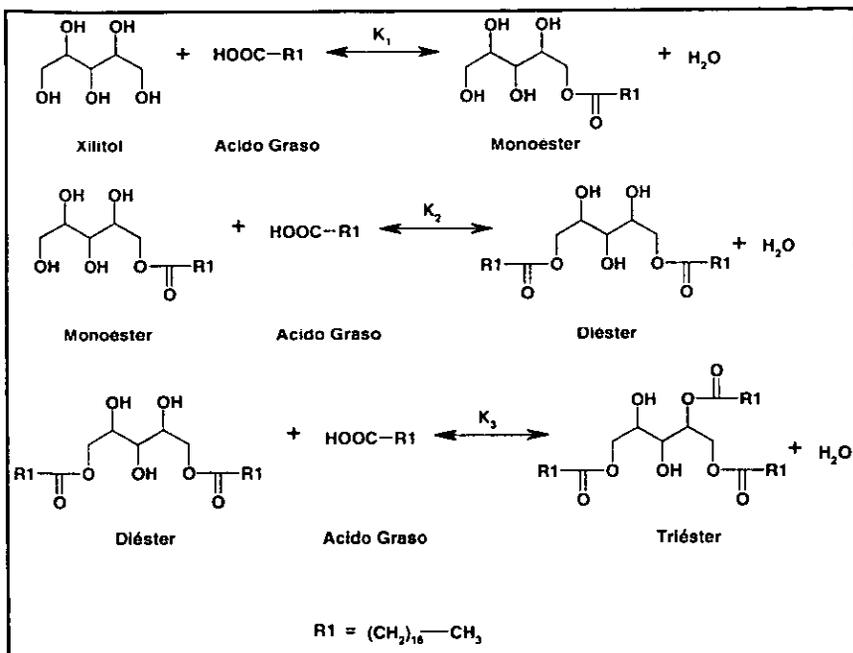
La temperatura es otro parámetro que juega un papel importante dentro de la síntesis enzimática. De manera general, se sabe que al aumentar la temperatura se logra una mayor solubilización de los componentes en el medio de reacción, lo que provoca un cambio en las concentraciones en solución y en consecuencia en las actividades termodinámicas. Un cambio en la temperatura puede ser determinante para la modificación de las condiciones finales de reacción. Lógico sería pensar que a mayores temperaturas se obtendrían mejores conversiones, pero esto no siempre ocurre debido principalmente a dos causas. La primera dependerá del tipo de enzima que se utilice, algunas enzimas son lo suficientemente

termoestables como para catalizar reacciones a temperaturas sumamente elevadas mientras que otras pueden no serlo (Arroyo et al 1999). La segunda dependerá de los diferentes compuestos presentes en el medio de reacción. La solubilidad es función de la temperatura, pero existen variables que determinan mejor el comportamiento en solución como lo es la actividad. La relación que puede existir entre la actividad y la temperatura dependerá principalmente de los componentes en solución y no siempre un aumento en la actividad de ciertos componentes refleja un aumento en la conversión de la reacción (Castillo et al. 1998).

### **3.7.1 Uso de la Ingeniería de Solventes**

La actividad de sustratos y productos en un medio de reacción puede ser modificada por las interacciones con los demás componentes que se encuentran en el sistema. La manipulación del medio de reacción, que es el mayor componente en el sistema, nos permite modificar las actividades de productos y reactivos provocando que sean mas o menos disponibles para reaccionar. Esta manipulación es conocida comunmente como ingeniería de solventes.

A manera de ejemplo en la figura 2.6 se representa el esquema general de la esterificación de xilitol con ácidos grasos.



**Figura 2.6** Esquema general de las reacciones de esterificación del xilitol y ácido graso

La estructura del xilitol está compuesta por cinco grupos hidroxilo lo cual permite diferentes posiciones y diferentes grados de esterificación dando lugar a mono-, di-, tri-, tetra- e inclusive pentaésteres. La selectividad para ciertas posiciones depende de la reactividad de cada uno de los grupos reactivos. El xilitol tiene dos grupos hidroxilo primarios y tres grupos hidroxilo secundarios, lo cual hace que los primeros sean mas reactivos y por ende una mayor probabilidad de realizar reacciones en estos sitios. Cada uno de estos productos tendrá una hidrofobicidad característica dependiendo de la posición de esterificación y del grado de esterificación. Mientras mayor sea el grado de esterificación, mayor será la hidrofobicidad y mayor su capacidad para interactuar con disolventes hidrofóbicos. Esta mayor interacción con el medio provocará una disminución en su disponibilidad y por lo tanto una menor actividad termodinámica. La consecuencia directa de este comportamiento sería la acumulación del producto en el medio de

reacción hasta un nivel que permita alcanzar el equilibrio termodinámico de la reacción. Manipulando el medio de reacción sería entonces posible modificar la reactividad de algunos grupos haciendolos mas o menos disponibles según se requiera.

En recientes investigaciones se ha probado que el perfil de productos puede ser manipulado mediante la utilización de mezclas de disolventes polares o hidrofóbicos como medio de reacción (Castillo et al 1998, Plou et al 1999).

La ingeniería de solventes es una rama de la catálisis enzimática que se ha enfocado en la manipulación del medio de reacción de tal forma que se favorezca la selectividad de las reacciones hacia ciertos productos, dando una menor formación de subproductos y por ende menos procesos de purificación (Bellot et al 1998, Janssen et al 1993, Singh et al 1994).

En el caso de la esterificación del xilitol, el principal producto de interés son moléculas con bajo grado de esterificación ya que son los que podrían tener mayores aplicaciones en la industria alimentaria. Como ha sido reportado la producción de monoésteres se ve favorecida en alcoholes terciarios los cuales permiten la solubilización total de los ácidos grasos y una polaridad suficiente para hacer a los polioles lo suficientemente reactivos (Degn et al 1999, Ducret et al 1996, Ducret et al 1995, Mohapatra & Hsu 1999).

### **3.7.2 UNIFAC**

Como se mencionó con anterioridad la actividad termodinámica refleja mejor el comportamiento en solución que la concentración. La actividad termodinámica se relaciona a la concentración mediante el coeficiente de actividad, un parámetro termodinámico, de manera directamente proporcional. Existen diferentes técnicas para el cálculo teórico del coeficiente de actividad, aunque en realidad todo se basa en modelos teóricos de termodinámica molecular. UNIFAC (por sus siglas en inglés, UNiversal Function Activity Coefficient) es uno de los principales modelos teóricos que existen para la estimación de estos parámetros. El método UNIFAC para evaluar los coeficientes de actividad se basa en el concepto de que una mezcla debe considerarse como una solución de unidades

estructurales a partir de las cuales se han formado las moléculas, más que una solución de las moléculas. Estas unidades estructurales o subgrupos tienen dos propiedades que afectan el comportamiento en solución: el volumen relativo y el área superficial relativa. De los diferentes modelos teóricos que existen para el cálculo de propiedades termodinámicas UNIFAC es de los más sencillos y confiables y ha sido utilizado para este tipo de reacciones en diferentes investigaciones (Bellot et al 1998, Flores et al 1999, Wehtje & Adlercreutz 1997).

Con el empleo del modelo teórico UNIFAC es posible calcular los coeficientes de actividad para las especies involucradas en las reacciones de síntesis enzimática en disolventes orgánicos. Esto permite conocer de manera rápida y confiable el valor correspondiente a las actividades termodinámicas en solución, en especial el coeficiente de actividad del agua, que como se mencionó anteriormente es determinante en la selectividad, conversión y reversibilidad de las reacciones de síntesis enzimática. De ahí la importancia de modelos termodinámicos teóricos como UNIFAC para el estudio de las reacciones de síntesis enzimática en medios no-convencionales. En el anexo A se detallan las ecuaciones necesarias para el cálculo de coeficientes de actividad mediante el modelo UNIFAC, o para mayor conveniencia, el programa UNIFAC Calculator puede ser obtenido de la página web [www.chem.eng.usyd.edu.au/pgrad/bruce/unifacal/unifacal.htm](http://www.chem.eng.usyd.edu.au/pgrad/bruce/unifacal/unifacal.htm).

### **3.8 Xilitol**

Debido al papel importante que juega el xilitol como sustrato de las reacciones aquí estudiadas, consideramos importante hacer una recapitulación bibliográfica que nos permite destacar su potencial de aplicación industrial.

El xilitol ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), un azúcar natural, es un poliol normalmente encontrado en frutas y vegetales aunque también es producido por el hombre como parte de su metabolismo (5-15 g xilitol/día) (Parajó et al 1997). Desde un punto de vista tecnológico tiene el mismo poder edulcorante

que la sacarosa y puede ser empleado como sustituto en una gran variedad de productos alimenticios. Entre sus principales propiedades en la industria alimentaria se encuentran las siguientes:

- Tiene un sabor agradable y no deja resabio.
- Debido a su calor de disolución positivo, deja un sentimiento de frescura después de ser ingerido.
- Al no ser fácilmente degradado por la flora bucal reduce la caries dental y la formación de placa mediante la inhibición de la principal bacteria causante de la caries, *S. mutans* ([www.caloriecontrol.org/xylitol.html](http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html)).
- Contiene una tercera parte de las calorías que aporta la sacarosa.
- Utilizado como sustituto de azúcares en personas diabéticas debido a que el metabolismo del xilitol no va asociado a la insulina (Silva et al 1996).

El xilitol tiene muchas ventajas al ser utilizado como ingrediente alimenticio. Limita la tendencia en la obesidad debido a que tiene un valor calórico menor al de la sacarosa, lo cual lo hace muy apropiado para productos dietéticos. Tiene propiedades anticariogénicas lo cual hace que sea utilizado en pastas dentífricas y enjuagues bucales. Deja un sabor de frescura en la boca por lo que es utilizado en gomas de mascar y pastillas.

La incorporación de xilitol en formulaciones alimenticias mejora el color y el sabor sin cambiar las propiedades de las preparaciones y algunos estudios han demostrado que el uso de xilitol, solo o combinado con otros carbohidratos, mejora la textura, color y estabilidad de almacenamiento de algunos productos como yoghurts, jaleas, mermeladas y productos congelados (Parajó et al 1997).

Actualmente el xilitol es utilizado en diversos productos comerciales, como sacarificante en pastas dentífricas, enjuagues bucales y en pastillas.

Existen varios métodos para la producción de xilitol, aunque no todos son empleados actualmente debido a su alto costo (Parajó et al 1998).

Actualmente existen tres métodos para la producción de xilitol. El primero mediante extracción sólido-líquido de algunos vegetales (fresas, lechuga, zarzamora, platano, uvas) así como en levaduras, algas de mar y hongos

(Parajó et al 1997). El segundo método consiste en la síntesis química a partir de xilan, un polisacárido perteneciente a la biomasa vegetal, mediante un intermediario, la xilosa. Este método se lleva a cabo mediante reacciones de hidrólisis ácida e hidrogenación. Debido a los diversos procesos que involucra y a conversiones bajas (50-60%) este método resulta ser sumamente costoso (Parajó et al 1998). El último método es mediante procesos biotecnológicos en los que se emplea microorganismos y/o enzimas para la producción de xilitol. Existen diversos microorganismos capaces de producir xilitol como son las bacterias, los hongos y las levaduras. En todos estos métodos se utiliza la capacidad enzimática de los microorganismos para la conversión de xilosa a xilitol, pero también existen métodos en los cuales solamente se hace uso de las enzimas prescindiendo de los microorganismos. Aunque los procesos biotecnológicos para la producción de xilitol no han sido implementados industrialmente, se espera que en un futuro sean una alternativa a la síntesis química (Silva et al 1996, Preziosi-Belloy et al 2000). El rápido crecimiento del mercado y el gran valor agregado del xilitol lo hacen un sustrato o materia prima ideal para la formación de nuevos productos como lo son los ésteres de xilitol. Estos emulsificantes pueden y son utilizados en diversas áreas de la industria farmacéutica y alimentaria, además de que contienen importantes propiedades nutricionales.

### **3.9 Conclusiones Generales del Estudio Bibliográfico**

En términos generales, el estudio bibliográfico lleva la conclusión de ciertos puntos interesantes. En primer lugar, que los emulsificantes, formados básicamente por una cabeza polar y una cadena hidrocarbonada, tienen la propiedad de adherirse a la interfase de una solución de dos líquidos parcial o totalmente inmiscibles. Esta propiedad está determinada por la naturaleza química de los dos grupos presentes en la molécula. Entre los productos más interesantes desde un punto de vista de la búsqueda de un proceso industrial tenemos a los emulsificantes no-iónicos. Estos, en efecto, componen un porcentaje elevado de los emulsificantes utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica. Un segundo punto interesante a subrayar, es el hecho de que estas moléculas podrían utilizar recursos renovables en su proceso de síntesis. Por otro lado, se observó de manera general que casi la totalidad de los procesos tradicionales para la producción de estos emulsificantes requieren de condiciones drásticas para la realización de las reacciones. Estas condiciones implican altas temperaturas de reacción (200-250 °C) y altas presiones (5-10 atm) además del uso de catalizadores inorgánicos sumamente costosos y difíciles de recuperar. Tomando en consideración estas limitantes, surge la necesidad de implementar nuevos métodos de producción de emulsificantes no-iónicos mediante el desarrollo de procesos que no requieran condiciones tan drásticas. A partir del desarrollo biotecnológico en el área de biocatálisis se ha demostrado que las reacciones de síntesis enzimática en medios no convencionales representan una alternativa para la producción de emulsificantes y agentes tensoactivos. En este contexto, es posible concluir que las lipasas son capaces de realizar reacciones de hidrólisis inversa al ser confrontados a condiciones de reacción apropiadas para este fin, por lo cual son ampliamente recomendadas para la síntesis enzimática de ésteres de polioles. Cabe señalar que se ha reportado que la utilización de disolventes orgánicos como medio de reacción debido al bajo contenido de agua que pueden tener es el medio de reacción más adecuado para este tipo de procesos.

Un dato adicional sería que se ha encontrado que la especificidad y los rendimientos de las reacciones estudiadas en este tipo de medios dependen fuertemente de dos variables: la actividad de agua en el sistema y la naturaleza del medio de reacción. La actividad de agua en los sistemas de reacción de síntesis enzimática representa una variable crítica que conlleva a establecer la posición del equilibrio termodinámico de la reacción. Por otro lado, se ha reportado ampliamente que la naturaleza del medio de reacción determina en gran manera la actividad y selectividad de las enzimas hidrolíticas, en nuestro caso particular, las lipasas.

Varios son los métodos de síntesis enzimática que han sido reportados y el interés por estos procesos va en aumento. Mediante estas reacciones se ha propuesto la síntesis de diversos emulsificantes a base de recursos naturales renovables tales como el glicerol, la sacarosa o el sorbitol. Como se ha venido discutiendo en este capítulo, estos sustratos, debido a su estructura química, representan un gran potencial en la síntesis de emulsificantes. En términos de sus aplicaciones específicas, el alto contenido de grupos hidroxilo en la molécula del xilitol incrementa de sobremanera su gran potencial de aplicación ya que pueden ser esterificados por una gran variedad de ácidos grasos disponibles.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Este proyecto se enfoca hacia la síntesis enzimática dirigida de ésteres de xilitol y ácido oléico utilizando estrategias de ingeniería de solventes y al estudio de las condiciones que permiten un control sobre las proporciones relativas de productos en el equilibrio. Con este objetivo se han formulado los siguientes objetivos particulares.

### 4.2 Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones de síntesis enzimática dirigida de ésteres de xilitol mediante el uso de lipasa en medios de reacción no convencionales.
- Estudiar las variables que determinan la especificidad de la reacción, evaluando el efecto del solvente sobre el grado de esterificación de las moléculas sintetizadas, así como las condiciones que permitan controlar la composición de la mezcla en el equilibrio termodinámico de las reacciones estudiadas.
- Comparar los resultados obtenidos experimentalmente con los datos obtenidos a través de la utilización del modelo teórico UNIFAC. Así mismo, realizar los cálculos correspondientes de coeficientes de actividad termodinámica de sustratos y productos en diferentes sistemas de reacción.
- Estudiar el comportamiento cinético de las reacciones de síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.
- Observar el efecto producido sobre la composición de la mezcla en el equilibrio por la modificación de las relaciones estequiométricas iniciales entre xilitol y ácido oléico.
- Finalmente, extender las aplicaciones de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico en medios de reacción no convencionales a otros polioles como la sacarosa.

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Materiales

Los reactivos utilizados a lo largo de este proyecto fueron adquiridos de proveedores comerciales en su más alto grado de pureza. El 2-metil 2-butanol (2M2B), 2-metil 2-propanol (2M2P), dimetilsulfóxido (DMSO), cloroformo, hexano, eter etílico, ácido acético fueron adquiridos de J.T. Baker. Metanol, acetona y acetonitrilo fueron adquiridos de Burdick & Jackson. El xilitol, ácido oléico, tamiz molecular (5A, 8-12 beads) y el ácido trifluoroacético fueron adquiridos de Sigma. La sílica gel 60 se adquirió de la empresa Merck.

La enzima inmovilizada Novozym 435<sup>®</sup> fué obsequiada por Novo Nordisk A/S (España). La enzima Novozym 435<sup>®</sup> es una triacilglicerol hidrolasa (E.C. no. 3.1.1.3). Esta enzima es producida por la compañía Novo Nordisk A/S y es obtenida mediante tecnologías de DNA recombinante a partir de *Candida antarctica*. Se comercializa de forma inmovilizada en una resina acrílica macroporosa (Lewatit E) lo que permite aumentar su estabilidad.

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Síntesis Enzimática de Ésteres de Polioles

Las reacciones de síntesis enzimática fueron efectuadas de manera general en frascos viales de 15 ml con 10 ml de volumen de reacción. Se adicionan 76 mg (50 mM) de xilitol al medio de reacción y se mantiene en agitación constante hasta observar una completa disolución. Posteriormente se adicionan 141 mg (50 mM) de ácido oléico, 100 mg de enzima Novozym 435<sup>®</sup> y 250 mg de tamiz molecular. El medio de reacción se mantuvo en un baño de agua a 45<sup>o</sup>C con agitación constante y se extrajeron muestras de 500 µl para su análisis por TLC y HPLC. A menos que se especifique, se considera este procedimiento como el procedimiento estandar de reacción.

### 5.2.2 Análisis Cualitativo del Medio de Reacción

El análisis cualitativo del medio de reacción se llevó a cabo mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina (TLC). Se utilizaron placas de gel de sílica Alugram<sup>®</sup> Sil G/UV<sub>254</sub> de Macherey-Nagel y un sistema de elución de tres fases. Este método se basa en la separación de productos en función de su hidrofobicidad-polaridad. El sistema de fases de elución presentado en la tabla 4.1. permite la elución selectiva de los componentes en función de su afinidad por la fase móvil. De esta forma la fase móvil menos hidrofóbica como la de cloroformo/metanol/agua eluye todos los componentes exceptuando al xilitol. La fase compuesta por cloroformo/metanol/ácido acético permite la elución selectiva de los diésteres, el ácido oléico y los triésteres y finalmente la fase hexano/eter/ácido acético eluirá solamente los componentes más hidrofóbicos como los triésteres y el ácido oléico. Posterior a la elución se introducen las placas en un horno a 250°C durante 5 min para evaporar la fase móvil. El revelado se efectuó rociando una solución al 5% de ácido sulfúrico en metanol y mediante calentamiento a 100-150°C durante cinco minutos. Este tratamiento induce la oxidación de ácidos grasos y sus derivados, en este caso, los ésteres de xilitol. Los Rf's obtenidos para los diferentes estándares fueron: xilitol 0.0, monoéster de xilitol 0.17-0.3, diéster de xilitol 0.36-0.58, triéster de xilitol 0.62-0.71, ácido oléico 0.75-0.89.

**Tabla 4.1** Sistema de fases de elución para el análisis de las reacciones de síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico por cromatografía en capa fina (TLC).

Fase	Porcentaje de Elución *
Cloroformo/Metanol/H <sub>2</sub> O 85:13.5:1.5	0.22
Cloroformo/Metanol/Ac. Acético 98.5:1.5:1	0.44
Hexano/Eter Etilico/Ac Acético 70:30:1	0.94

\* El porcentaje de elución es referente a la longitud libre de elución sobre la placa

### 5.2.3 Análisis Cuantitativo del Medio de Reacción

El análisis cuantitativo de los principales productos de reacción se realizó mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se tomaron muestras de 500  $\mu$ l del medio de reacción, se centrifugaron para eliminar la enzima y el tamiz molecular y se evaporó el medio de reacción en un evaporador centrífugo al vacío a temperatura de 55 °C y 0.20 bar de presión de vacío. Posteriormente se resuspendieron las muestras en la fase móvil correspondiente. Se desarrollaron dos técnicas para el análisis de los diferentes productos de reacción dependiendo de su solubilidad en disolventes polares e hidrofóbicos.

- (a) Para el análisis de los dos sustratos (xilitol y ácido oléico) y de los monoésteres se utilizó como fase móvil Metanol/Agua/Ácido Trifluoroacético 95:5:0.1 (v/v) a un flujo de 1 ml/min. Se utilizó un controlador Waters 600E con control de temperatura ajustado a 45 °C; un detector de Índice de Refracción (IR) Waters 410; Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 5  $\mu$ m (25 \* 4.6 mm).
- (b) Para el análisis de los demás productos de reacción se utilizó un fase móvil compuesta por Acetona/Acetonitrilo 50:50 (v/v) con un gradiente de flujo como se muestra en la tabla 4.2. Se utilizó un controlador Waters 600E con control de temperatura ajustado a 45 °C un detector de ultravioleta (UV) Waters 486 y un detector de ultravioleta con arreglo de diodos Waters 996. Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 5  $\mu$ m (25 mm x 4.6 mm).

**Tabla 5.2** Gradiente de flujo para el análisis de diésteres y triésteres de xilitol y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Acetona	% Acetonitrilo
	1	50	50
12	1	50	50
14	3	50	50
18	3	50	50
22	1	50	50
24	1	50	50

#### **5.2.4 Purificación de los Productos de Reacción**

La purificación de los diferentes productos de reacción se efectuó para reacciones de 200 ml como volumen de reacción a las mismas condiciones mencionadas anteriormente: 1.520 g de xilitol (50 mM), 2.820 g de ácido oléico (50mM), 2 g de enzima Novozym 435<sup>®</sup> y 5 g de tamiz molecular.

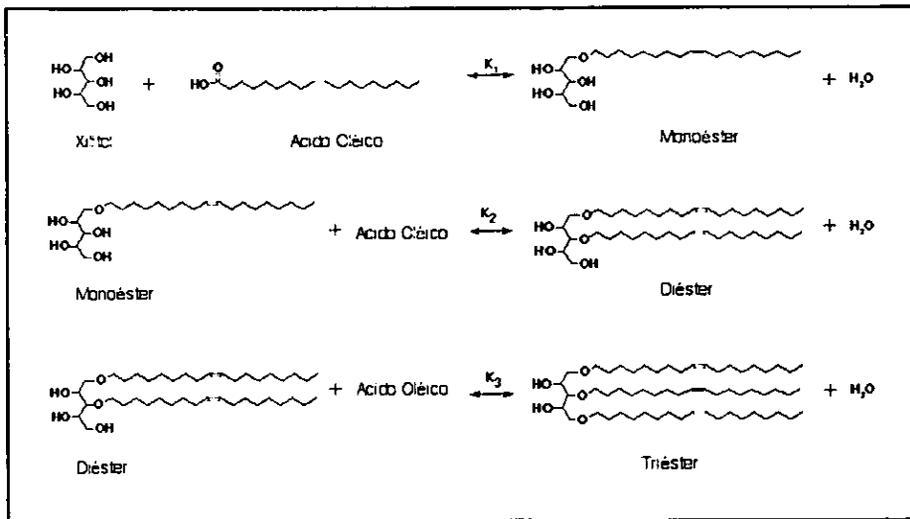
Para la purificación de los diferentes productos de reacción los siguientes equipos y materiales fueron utilizados: Rotavapor, cartuchos de separación Sep-Pak Plus C-18<sup>®</sup> marca Waters y placas de gel de sílica Alugram<sup>®</sup> Sil G/UV<sub>254</sub> de Macherey-Nagel preparativas. Al ser ésta una metodología original de purificación, los detalles se presentan en la sección de resultados.

## 6 Resultados y Discusiones

### 6.1 Síntesis Enzimática de Esteres de Xilitol y Acido Oléico

#### 6.1.1 Reacciones de Esterificación de Xilitol con Acido Oléico

La primera etapa de este proyecto fué establecer la factibilidad de la reacción de esterificación de xilitol con ácido oléico mediante reacciones catalizadas por enzimas de acuerdo al sistema de reacción representado en la figura 5.1.



**Figura 5.1** Representación esquemática de las reacciones de esterificación del xilitol y ácido oléico

Se realizaron las reacciones de síntesis enzimática en frascos viales de 15 ml utilizando 10 ml como volumen de reacción. Las condiciones de reacción empleadas en este proyecto fueron seleccionadas tomando en consideración por un lado la solubilidad máxima que presenta el xilitol en estos medios de reacción. El xilitol es un sustrato muy polar y es altamente soluble en agua (64.2g/100g soln.), sin embargo presenta poca solubilidad en disolventes orgánicos. Se ha reportado (Bousquet et al 1999) que sustratos polares, tales como los polioles, presentan una buena solubilidad en alcoholes terciarios. Tomando esto en consideración, se propuso efectuar las

reacciones de síntesis enzimática de los ésteres de xilitol en 2-metil-2-butanol (2M2B) y 2-metil-2-propanol (2M2P). Una segunda ventaja que ofrece el trabajar con alcoholes terciarios es que no reaccionan con las lipasas dado que estas enzimas presentan especificidad exclusivamente para alcoholes primarios y secundarios. Se seleccionó una concentración inicial de 50 mM para el xilitol, concentración en la cual este sustrato se encuentra completamente soluble en los alcoholes propuestos como medio de reacción. Por su parte, el ácido oléico no presenta problemas de solubilidad en este tipo de medios ya que a temperaturas superiores a los 13.4°C es líquido y miscible en una amplia gama de disolventes. El ácido oléico se utilizó de igual forma en concentraciones iniciales de 50 mM, concentración que correspondería *a priori* a una relación estequiométrica para la formación de monoésteres de xilitol. El procedimiento general de las reacciones, consistió en primer lugar en adicionar el poliol (xilitol) al medio de reacción agitando hasta su disolución total. Posteriormente, se agregó el ácido oléico y se registraron los blancos de la reacción. Posteriormente se agregó el tamiz molecular, el cual permite adsorber el agua formada a lo largo de la reacción y mantener la concentración de agua al nivel mas bajo posible en el sistema de reacción. Finalmente se adicionó la enzima. La tabla 5.1 muestra la composición en masa de cada uno de los componentes del medio de reacción.

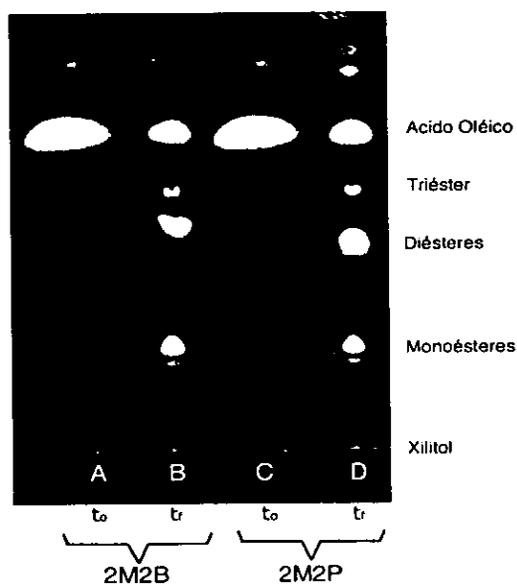
**Tabla 5.1** Composición del medio de reacción de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol.

Componente	Cantidad
Xilitol	76 mg (50 mM)
Acido Oléico	141 mg (50 mM)
Disolvente (2M2B, 2M2P)	10 ml
Enzima Novozym 435 <sup>®</sup>	100 mg
Tamiz Molecular	250 mg

Para la realización de las reacciones de síntesis se utilizó la enzima Novozym 435<sup>®</sup> de Novo Nordisk, una lipasa inmovilizada en una resina acrílica y

reportada como eficiente en reacciones de síntesis enzimática en medios orgánicos (Arroyo et al 1999). Se prefirió la utilización de enzimas inmovilizadas como catalizadores en la reacción ya que esto permite una fácil recuperación de la enzima y una mayor estabilidad en disolventes orgánicos. Se utilizaron 10 mg/ml (1% w/v) de enzima Novozym 435<sup>®</sup> en el sistema de reacción, concentración que desde un punto de vista económico se considera adecuada para un eventual escalamiento del proceso. Estas condiciones de reacción fueron empleada en el resto del proyecto, salvo que alguna modificación sea especificada.

Los resultados de las primeras reacciones efectuadas se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC). Mediante esta técnica fué posible la detección de diversos productos de reacción así como la disminución en la concentración de los sustratos después de 48 h. En la figura 5.2 se muestra el análisis por TLC realizado para la esterificación de xilitol con ácido oléico.



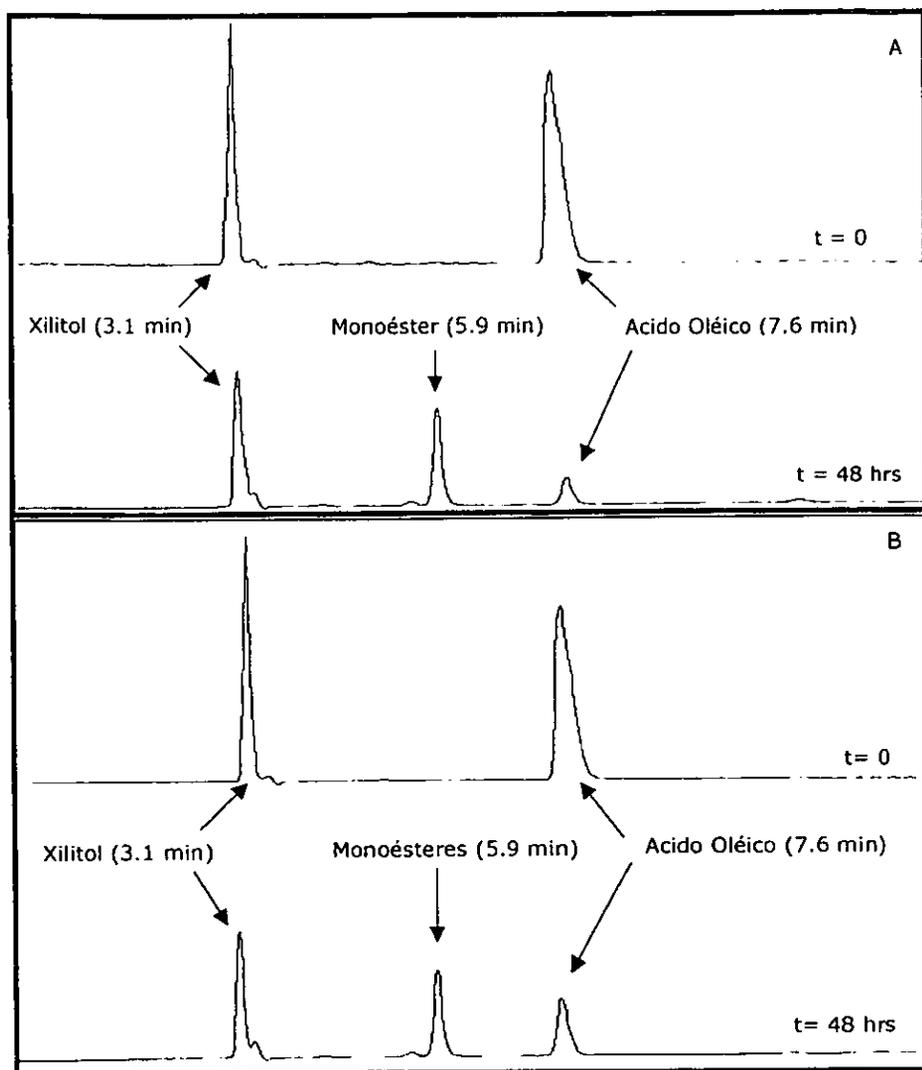
**Figura 5.2** Análisis de TLC de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol (50 mM) y ácido oléico (50 mM) en diferentes medios de reacción: A y B: 2-metil-2-Butanol (2M2B). B y C: 2-metil-2-propanol (2M2P). Los análisis corresponden a tiempos iniciales de reacción (A Y C) y muestras analizadas después de 48 hrs. (B y D).

En esta figura podemos observar que a las 48 hrs aparecen diferentes productos que podríamos agrupar en función de su hidrofobicidad. De acuerdo a la distribución de las fases móviles en el sistema de elución, los componentes de la muestra tendrán un valor de  $R_f$  mayor en la medida que su hidrofobicidad aumente. De esta forma se pueden identificar productos con hidrofobicidades mayores correspondiendo a productos con diferentes grados de esterificación. En la placa observamos que los diferentes grupos de productos corresponden a diferentes grados de esterificación del xilitol de acuerdo a sus valores de  $R_f$  (monoéster de xilitol 0.17-0.3, diéster de xilitol 0.36-0.58, triéster de xilitol 0.62-0.71). Además se observó que para cada disolvente utilizado existe un perfil particular de productos. Se observan por ejemplo al menos 3 diferentes diésteres cuando se tiene 2M2B como disolvente de reacción y solo 2 en 2M2P. Estos productos presentaron diferencias en las hidrofobicidades dentro de cada grupo (grado de esterificación) al que pertenecen. Así, dentro del grupo de los monoésteres de xilitol los isómeros posicionales corresponderían a (1(5)-monooleilxilitol, 2(4)-monooleilxilitol y 3-monooleilxilitol) los cuales suponemos presentan diferentes hidrofobicidades y se sintetizan de manera diferente en función del disolvente de la reacción.

Estos resultados nos permitieron establecer de manera preliminar la factibilidad de llevar a cabo la reacción entre el xilitol y el ácido oléico catalizada por la lipasa Novozym®, además de establecer el efecto de la naturaleza del disolvente sobre el grado de esterificación y el tipo de productos de síntesis.

Un segundo análisis de los productos se realizó utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica nos permitió observar y cuantificar la desaparición de los sustratos xilitol y ácido oléico así como la formación de los diferentes productos de síntesis. La cuantificación de los sustratos se hizo analizando muestras estándar de ambos sustratos. Con las técnicas empleadas conforme mayor es la hidrofobicidad del compuesto mayor será su tiempo de retención en la columna.

Los análisis realizados por HPLC se presentan en la figura 5.3.



**Figura 5.3** Análisis de HPLC de los productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol (50 mM) y ácido oléico (50 mM) en diferentes medios de reacción: A.- 2-metil-2-Butanol (2M2B) y B.- 2-metil-2-Propanol (2M2P). Los análisis corresponden a tiempos iniciales reacción y después de 48 hrs.

En esta figura se observa un perfil de desaparición de ácido oléico diferente al perfil de desaparición del xilitol, dado que el consumo de ácido oléico no está asociado directamente al consumo de xilitol. Este comportamiento se

explica por el hecho de la existencia de productos con diferentes grados de esterificación. Es decir, por cada molécula de xilitol libre que se esterifica, una o más moléculas de ácido oléico se consumen para la formación de mono-, di-, y triésteres, como consecuencia de esto conforme aumenta el grado de esterificación de los productos de síntesis, la relación molar entre el ácido oléico consumido y el xilitol aumenta. Por otro lado, en los cromatogramas presentados, de manera similar a los análisis por TLC, se observa la aparición de diferentes productos de síntesis correspondiendo a diferentes grados de esterificación de la molécula de xilitol. Sin embargo, las concentraciones encontradas para los diésteres y triésteres no corresponden a lo observado en los análisis por TLC. Aparentemente el método de análisis no resultó ser adecuado para la cuantificación de estos polioles de xilitol. Por esta razón, se decidió desarrollar un método adecuado de cuantificación por HPLC de los productos obtenidos.

### **6.1.2 Desarrollo de los Métodos Analíticos**

Esta etapa del trabajo de investigación consistió en el desarrollo de métodos analíticos que nos permitieran diferenciar los productos de reacción en función de su grado de esterificación.

El análisis cuantitativo del medio de reacción se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De manera similar a la técnica de TLC este método se desarrolló en función de las diferencias de polaridades de los productos obtenidos en las reacciones de síntesis de ésteres. Se eligieron dos técnicas para el análisis de los diferentes productos de reacción dependiendo de su solubilidad en disolventes polares e hidrofóbicos. Para el análisis de los dos sustratos (xilitol y ácido oléico) y de los productos menos hidrofóbicos se utilizó un fase móvil compuesta por Metanol/Agua/Ácido Trifluoracético. Esta fase permite separar los componentes de una muestra en función de su hidrofobicidad, o la afinidad que tengan por la fase estacionaria  $C_{18}$ . Se seleccionó la composición Metanol/Agua/Ácido Trifluoracético 95:5:0.1 (v/v) a un flujo de 1 ml/min pues esto nos permitió una mejor separación y cuantificación de xilitol,

monoésteres y ácido oléico.

Para el análisis de los productos de reacción mas hidrofóbicos se utilizó una fase móvil de Acetona/Acetonitrilo 50:50 (v/v) eluido isocráticamente con un gradiente de flujo como se muestra en la tabla 5.2.. Las condiciones reportadas fueron aquellas que nos permitieron la mejor separación de los diésteres y triésteres.

**Tabla 5.2** Gradiente de flujo para el análisis de diésteres y triésteres de xilitol mediante HPLC

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)
	1
12	1
14	3
18	3
22	1
24	1

## **6.2 Caracterización de los Principales Productos de Reacción**

Una vez demostrada la factibilidad de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y que se desarrollaron los métodos de análisis de los productos de la reacción se procedió a su recuperación y purificación.

Para la recuperación de los diferentes productos de reacción se aplicaron diferentes técnicas de purificación de acuerdo a las características de los productos, tales como solubilidad en disolventes hidrofóbicos y afinidad por diferentes fases estacionarias tales como sílica y sílica C-18.

### **6.2.1 Desarrollo de las Metodologías de Purificación y Recuperación de Productos**

Para la purificación de los productos obtenidos de las reacciones estudiadas, se realizaron reacciones en 200 ml de medio de reacción, manejando concentraciones similares a las antes mencionadas (50 mM xilitol, 50 mM ácido oléico, 10 mg de enzima /ml de medio de reacción, 25 mg de

tamiz molecular/ml de medio de reacción) a 45 °C con agitación continua. Se toman muestras para la cuantificación de xilitol y ácido oléico para comprobar que la reacción llegó al equilibrio. Una vez alcanzado el equilibrio de la reacción, se filtra el medio de reacción para eliminar la enzima y el tamiz molecular, y se evapora el medio de reacción en un rotavapor a 70 °C, 120 rpm y 0.8 bar de presión de vacío durante dos horas.

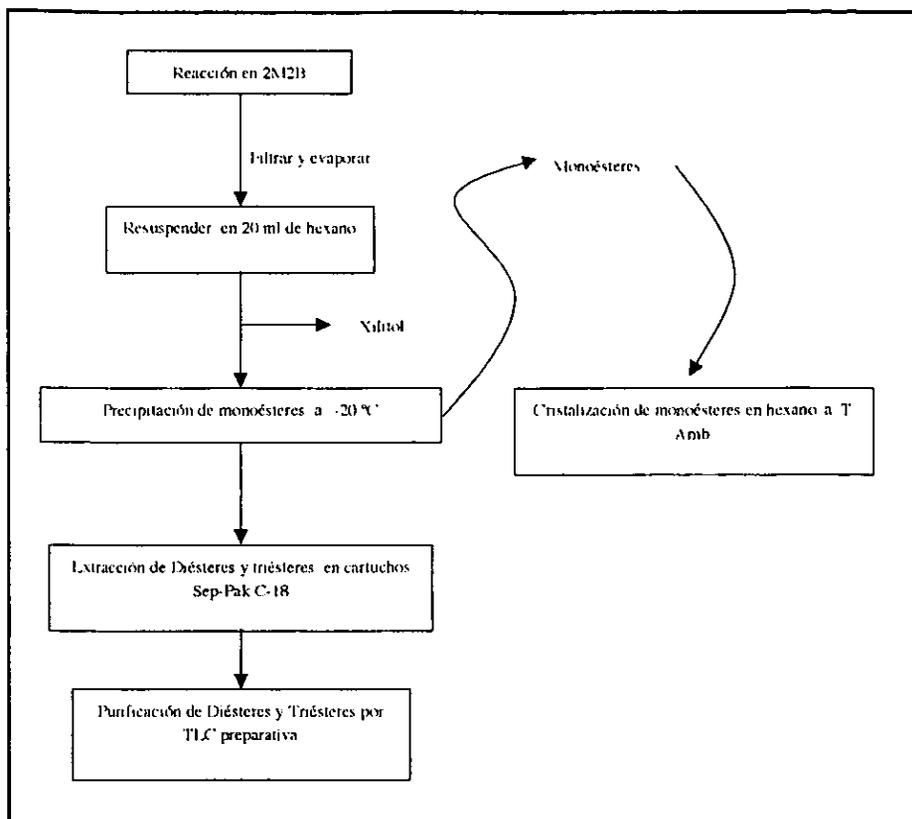
Al residuo se agregan 50 ml de hexano para inducir la precipitación del xilitol, y mediante decantación se elimina el xilitol precipitado pues es insoluble en disolventes altamente hidrofóbicos como el hexano. Una vez eliminado el xilitol residual se procedió a separar los productos de la reacción del ácido oléico residual. En primer lugar, los monoésteres son purificados mediante cristalización en la solución de hexano a -20 °C y posteriormente mediante filtración en frío (4 °C) se recuperan y se lavan los cristales. Para la eliminación de posibles contaminantes residuales, los cristales de monoésteres se resuspendieron en un volumen mínimo de hexano induciendo así una precipitación a temperatura ambiente. Los cristales puros de monoésteres obtenidos son recuperados mediante filtración y analizados por TLC y HPLC para cuantificar su grado de pureza.

Para la purificación de los ésteres con mayor grado de esterificación se utilizó un método diferente que consistió en la adsorción-elución selectiva en cartuchos de separación Sep-Pak Plus C-18<sup>®</sup> marca Waters los cuales presentan una gran afinidad por moléculas hidrofóbicas. Las soluciones de hexano recuperadas después de la purificación de los monoésteres y recuperación del xilitol son sometidas a evaporación en un rotavapor a 45 °C, 100 rpm y 0.8 bar de presión de vacío hasta la obtención de un residuo aceitoso. Paralelamente, los cartuchos de separación son activados mediante la elución de 5 a 10 volúmenes de metanol y agua, y posteriormente equilibrados con la fase móvil Metanol/Agua 90:10 (v/v). Una vez equilibrados los cartuchos, se introduce la muestra aceitosa previamente solubilizada en hexano (50 µl de muestra por 200 µl de hexano), y se eluyen 5 volúmenes de fase móvil Metanol/Agua 90:10 (v/v). Debido a que la fase estacionaria interactúa con las moléculas hidrofóbicas, en esta etapa se

eluyen las moléculas menos hidrofóbicas como son los monoésteres y el ácido oléico residual. Posteriormente se eluyen de 10 a 15 volúmenes de fase móvil hexano para eluir los componentes mas hidrofóbicos o con mayor grado de esterificación. La utilización de estos volúmenes de fase móvil fueron necesarios ya que la interacción de los productos hidrofóbicos con la fase estacionaria es muy fuerte. Las fracciones recolectadas de las eluciones con hexano son recuperadas y analizadas por TLC para comprobar su pureza. Para obtener una mayor pureza de los productos, las fracciones son eluidas varias veces por los cartuchos hasta la completa eliminación de monoésteres y ácido oléico residuales.

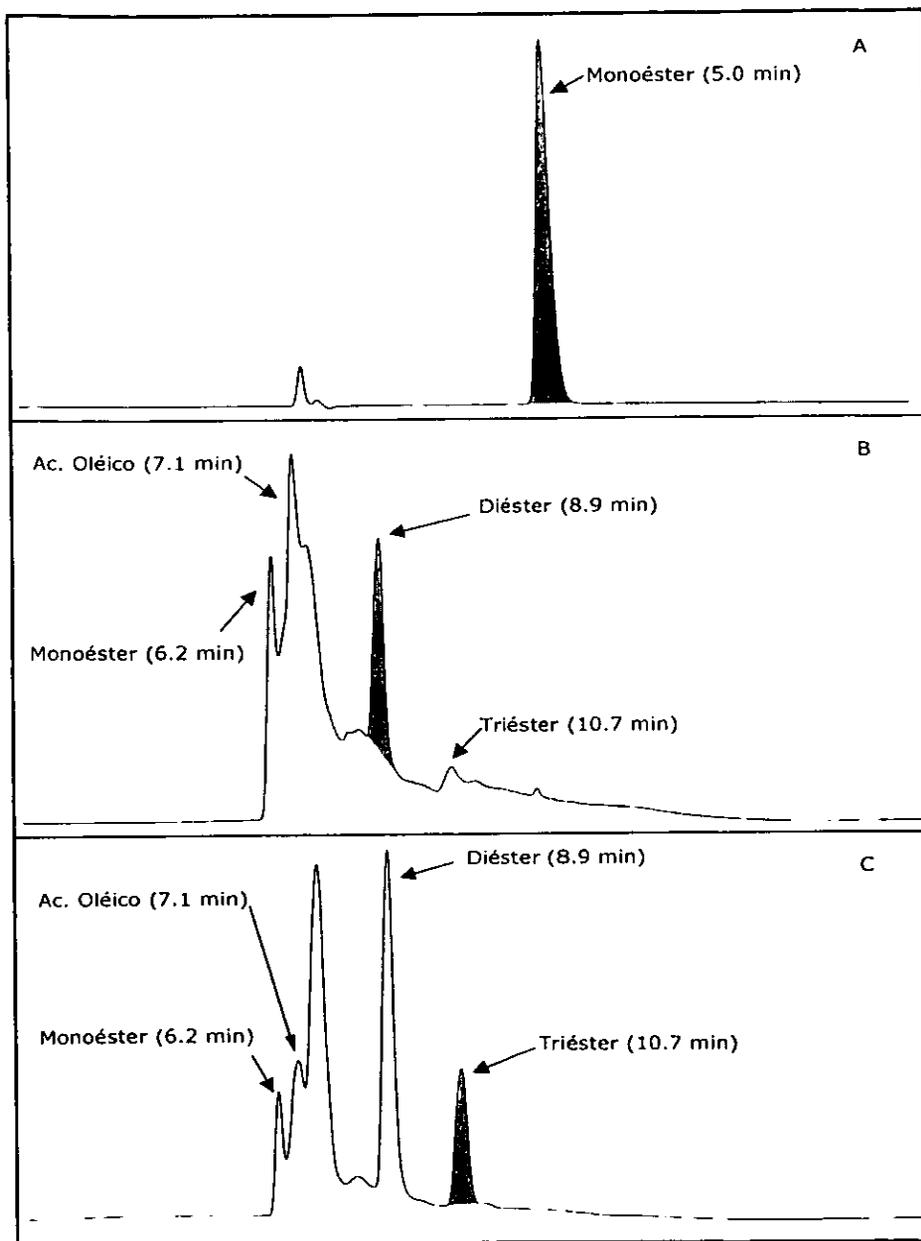
Los diferentes productos obtenidos después de la eliminación de los monoésteres y el ácido oléico residual fueron exhaustivamente purificados mediante TLC preparativa. Para esto, se utilizaron placas preparativas de gel de sílica Alugram® Sil G/UV<sub>254</sub> de Macherey-Nagel utilizando las mismas fases moviles que se utilizan para el metodo analítico. El principio de esta técnica es similar a la técnica analítica, sin embargo, dado que se manejan cantidades de productos mayores, la separación no es tan eficiente. Para la detección de los diferentes productos se utilizó una lampara de luz UV evitando así su descomposición por el proceso de revelado. Para el caso de los diésteres el residuo de sílica obtenido de las placas preparativas se solubilizó en una solución de Cloroformo/Metanol/Ac.Acético 98.5:1.5:1 (v/v) y para los triésteres se solubilizó en una solución de Hexano/Eter Etilico/Ac Acético 70:30:1 (v/v). Posteriormente se centrifugaron las muestras para eliminar los residuos de gel de sílica.

En la figura 5.4 se muestra un diagrama de flujo con los pasos principales del proceso de purificación desarrollado.



**Figura 5.4** Metodología de purificación de los diferentes productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.

Las fracciones purificadas se analizaron mediante TLC y HPLC para comprobar su pureza. La figura 5.5 nos muestra el análisis efectuado por HPLC en las condiciones presentadas anteriormente. Como se muestra en la figura 5.5 la fracción purificada de monoésteres fue en la que se logró una mayor pureza logrando identificar solamente monoésteres tanto en la técnica de HPLC como en la de TLC (no mostrada). Para las fracciones purificadas de diésteres y triésteres de acuerdo al análisis desarrollado no se alcanzó una total separación como se puede observar en la figura 5.5. Esto se puede deber a la poca resolución que tiene la separación mediante TLC preparativa.



**Figura 5.5** Análisis por HPLC de fracciones de purificado de monoésteres (A), diésteres (B) y triésteres (C)

Sin embargo aun en este nivel de purificación es posible observar las diferencias en hidrofobicidades en función del grado de esterificación de los productos obtenidos.

La fracción purificada de monoésteres fue analizada en función de su valor de  $R_f$  (0.22) y su tiempo de retención (5.0 min) para TLC y HPLC respectivamente. En términos de su hidrofobicidad y su valor de  $R_f$  en el análisis efectuado por TLC, la hidrofobicidad de la muestra purificada de monoéster corresponde a un valor intermedio al de ambos sustratos, además de presentar una hidrofobicidad menor a la muestra purificada de diésteres y triésteres lo que sugiere que el producto formado es un monoéster. Lo mismo sugiere el análisis efectuado mediante HPLC, en el cual el tiempo de retención para la muestra purificada de monoésteres tiene un valor intermedio al del xilitol y el ácido oléico para las dos técnicas de HPLC utilizadas.

### **6.2.2 Propiedades Físicas de los Monoésteres**

Una vez que se obtuvieron fracciones purificadas de monoésteres se analizaron algunas propiedades físicas importantes para los tensoactivos. La primera fué su punto de fusión. Se utilizó un Fisher Johns para determinar el punto de fusión que fué de 43-44 °C. El análisis fue llevado a cabo por duplicado para validar los resultados. Esto nos indica que la fracción de monoésteres contiene pocas impurezas debido a que el rango de cambio de fase es pequeño (1°C). Este punto de fusión bajo, aunado a su fácil solubilización en agua provoca que al estar en contacto con la boca pase rápidamente a su estado líquido. Esta propiedad se presenta atractiva para aplicaciones particulares en la industria alimentaria y cosmetológica.

La segunda propiedad que se estudió en la fracción purificada de monoésteres fué mediante una análisis sensorial del producto. Al entrar en contacto el producto con la punta de la lengua se percibe una sensación de frescura similar a la producida por el xilitol. Esto se supone es debido al calor de disolución positivo que posee la molécula de xilitol y que conservan los productos sintetizados. Además el monoéster de xilitol presentó una

textura agradable al gusto y al tacto, característica principal de los emulsificantes con aplicaciones en la industria alimentaria y cosmetológica.

### 6.3 Influencia del Medio de Reacción en la Síntesis Enzimática

#### 6.3.1 Síntesis Enzimática de Esteres de Xilitol y Acido Oléico en Diferentes Medios de Reacción

Con el propósito de estudiar en detalle el efecto de la naturaleza del medio de reacción en el equilibrio de la reacción y en consecuencia sobre la selectividad de los productos obtenidos, se realizaron varias reacciones modificando la composición del medio de reacción. Se utilizaron diferentes disolventes de acuerdo a su log P para obtener medios de reacción con polaridades diferentes. Inicialmente se seleccionó la polaridad del medio en función del log P como parámetro de selección del disolvente pues se trata de una propiedad física ampliamente utilizada en reacciones de síntesis enzimática (Dordick 1989, García-Alles & Gotor 1998, Lortie 1997, Wescott & Klivanov 1994).

**Tabla 5.3** Mezclas de disolventes utilizados para la síntesis enzimática de ésteres de xilitol.

Medio de Reacción	log P
2M2P/DMSO 80:20 (v/v)	0.36
2M2B/DMSO 80:20 (v/v)	0.77
2M2P	0.79
2M2B	1.3
2M2B/Hexano 50:50 (v/v)	2.15
Hexano	3.5

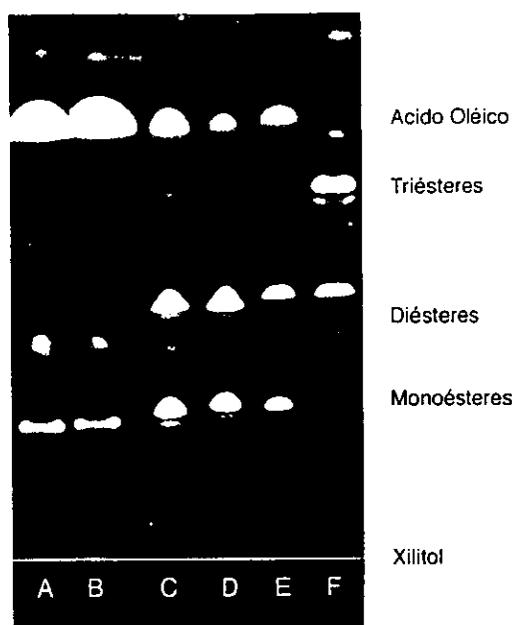
En la tabla 5.3 se muestran los diferentes disolventes empleados en este estudio así como su log P. Los valores correspondientes a las mezclas de disolventes fueron calculados mediante un promedio ponderado en función del volumen de cada uno en la mezcla de acuerdo a la ecuación 5.

$$\log P_{A,B} = \left[ \log P_A * (V_A / V_{A,B})_A \right] + \left[ \log P_B * (V_A / V_{A,B})_B \right] \quad \text{ec. 5}$$

En esta etapa se modificaron las condiciones de reacción normalmente empleadas, para esto, se utilizaron los disolventes y las mezclas de disolventes reportados en la tabla 5.3. El objetivo de estas modificaciones fué estudiar el efecto producido por el cambio en la polaridad del medio de reacción sobre el grado de esterificación del xilitol. Las demás condiciones de reacción fueron similares a las empleadas anteriormente (50 mM xilitol, 50 mM ácido oléico, 10 mg de enzima/ml de medio de reacción, 25 mg de tamiz molecular/ml de medio de reacción). Es importante mencionar que debido al cambio en la polaridad del medio de reacción la solubilidad del xilitol se ve afectada de tal forma que en medios de reacción polares como el 2M2P/DMSO es muy soluble, y en medios de reacción muy hidrofóbicos como el hexano, el xilitol es prácticamente insoluble.

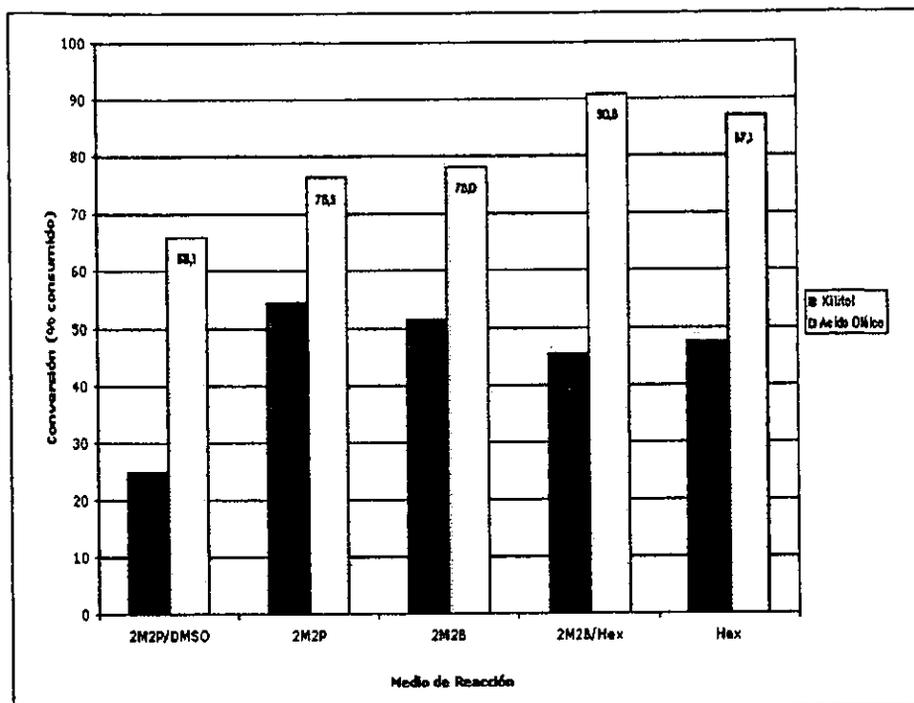
Las reacciones llevadas a cabo en los diferentes medios de reacción propuestos fueron analizadas por TLC y HPLC para observar el efecto producido por el cambio de polaridad del medio de reacción sobre el perfil de productos sintetizados.

En la figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos del análisis por TLC para las reacciones efectuadas en los diferentes sistemas de disolventes evaluados. En esta figura podemos observar los diferentes perfiles de síntesis de ésteres de xilitol en función del disolvente. Es claro que en la medida que se aumenta la hidrofobicidad del medio existe una marcada preferencia por la síntesis de los productos mas hidrofóbicos como los diésteres y los triésteres. Se observa una conversión casi total del ácido oléico en disolventes como el 2M2B/hexano y hexano lo que se explica por una síntesis dirigida hacia diésteres y triésteres. Por el contrario, en la medida en que el disolvente es mas polar (2M2B, 2M2P, 2M2B/DMSO, 2M2P/DMSO) la selectividad de la síntesis de productos más polares como los monoésteres aumenta considerablemente, aunado a una disminución en el consumo de ácido oléico.



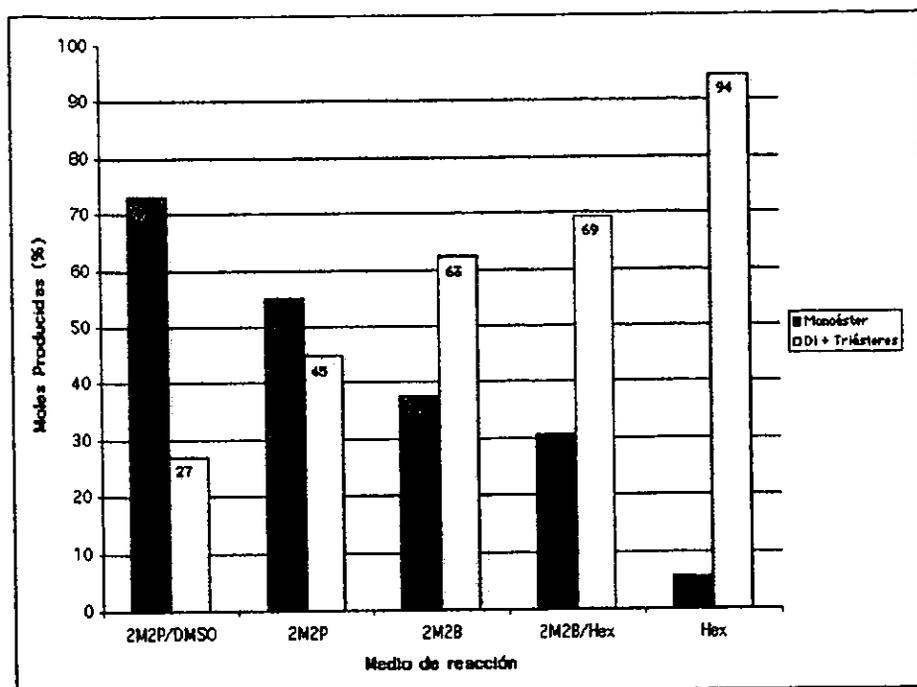
**Figura 5.6** Cromatograma de TLC en el que se muestra la influencia del medio de reacción sobre la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico. A: 2M2P/DMSO (80:20 (v/v)) log P=0.36; B: 2M2B/DMSO (80:20 (v/v)) log P=0.77; C: 2M2P log P=0.79; D: 2M2B log P=1.3; E: 2M2B/Hexano (50:50 (v/v)) log P=2.15; F: Hexano log P=3.5.

Paralelamente las muestras fueron analizadas por HPLC. En la figura 5.7 se muestran los resultados obtenidos del análisis por HPLC de las diferentes reacciones al equilibrio efectuadas en las mezclas de disolventes descritas en la tabla 5.3. Los resultados del HPLC fueron cuantificados comparando las áreas de los productos con curvas estándar analizadas anteriormente, las cuales fueron preparadas con los productos de las reacciones purificadas como se describió en la metodología.



**Figura 5.7** Influencia del medio de reacción sobre las conversiones al equilibrio de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.

Como podemos observar en la figura 5.7 las concentraciones de ácido oléico en el equilibrio no son las iguales para los diferentes disolventes empleados. La conversión de ácido oléico aumenta conforme aumenta la hidrofobicidad del medio de reacción, mientras que la conversión de xilitol no presenta grandes cambios. Este comportamiento se debe a que, como se mencionó anteriormente, en medios de reacción hidrofóbicos la síntesis de productos con alto grado de esterificación conlleva un consumo de ácido oléico superior. En la figura 5.8 se presentan los cálculos correspondientes a la conversión de monoésteres, diésteres y triésteres para las reacciones efectuadas en los medios de reacción descritos en la tabla 5.3. Estos cálculos corresponden a la conversión en moles de los diferentes productos en base a las moles de ácido oléico consumidas.



**Figura 5.8** Influencia del medio de reacción sobre el porcentaje de moles producidas de monoésteres, diésteres y triésteres de xilitol y ácido oléico.

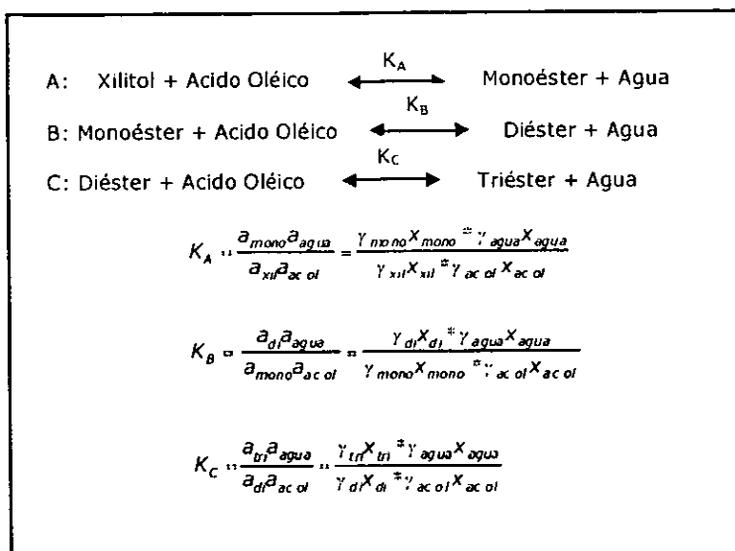
Como podemos observar en la figura 5.8, en los medios de reacción polares al haber una producción mayoritaria de monoésteres el ácido oléico consumido corresponde en su mayoría a la formación de monoésteres. Esto es, el 73% del ácido oléico consumido fué para la formación de monoésteres y el 27% del ácido oléico consumido restante para la formación de diésteres y triésteres. Al contrario de lo sucedido con los monoésteres, los diésteres y los triésteres son producidos mayoritariamente en disolventes hidrofóbicos como el hexano, lo que trae como consecuencia un mayor consumo de oléico debido a que la relación xilitol-oléico no se mantiene equimolar, sino con una proporción 1:2 para el caso de los diésteres y 1:3 para los triésteres. Debido a que el ácido oléico participa en todas las reacciones de esterificación, su conversión será mayor a medida que el disolvente permita sintetizar ésteres

con un grado de esterificación mayor al de los monoésteres. Cabe resaltar que la producción de monoésteres es mayoritaria cuando se utiliza como medio de reacción 2M2P/DMSO, 2M2P o 2M2B, ya que la producción de los demás ésteres alcanza un valor máximo de 63% para estos medios de reacción en el cual habría que contabilizar entre los diésteres y triésteres producidos. Cabe mencionar que la síntesis de monoésteres en medios de reacción polares como 2M2P/DMSO es preferencial (73% de los productos totales) aún cuando la conversión de xilitol y ácido oléico no es elevada (25% y 55% respectivamente). Dicho de otra manera, considerando que de 50 mM de oléico y 50 mM de xilitol la productividad máxima de monoésteres debería ser de 50 mM, en el mejor de los casos solo se obtuvo 16.5 mM correspondiente al 25% de rendimiento. Sin embargo, de este porcentaje el 73% corresponde a los monoésteres.

Como ya se mencionó, la tendencia general en la producción de ésteres de xilitol es que en medios de reacción polares se obtiene una mayor producción de monoésteres y en medios de reacción hidrofóbicos se obtiene una mayor producción de diésteres y triésteres. Este comportamiento podría ser explicado en función de las interacciones sustrato-productos-disolvente. Así, por ejemplo, en medios de reacción polares las interacciones entre moléculas afines es mayor, esto permite que las moléculas polares tengan una actividad o disponibilidad baja aún a altas concentraciones. Este fenómeno permite la acumulación de estas moléculas (monoésteres) en el medio de reacción en el cual su actividad es menor (disolventes polares) y así una mayor conversión hacia estos productos es favorecida. Para los diésteres y triésteres ocurre lo contrario, la afinidad es baja en medios de reacción polares, favoreciéndose una alta actividad aun a concentraciones bajas por lo que de esta manera no se acumulan en el medio.

Estos resultados pueden ser explicados en función de un desplazamiento termodinámico de las reacciones. La baja actividad termodinámica a altas concentraciones de monoésteres en disolventes polares permite un desplazamiento del sistema de reacción preferencialmente hacia la producción del monoéster hasta el punto en el que la alta concentración de

este producto compensa de manera proporcional su baja actividad alcanzando el equilibrio termodinámico. En medios de reacción hidrofóbicos la actividad de monoésteres será elevada a muy bajas concentraciones, lo que provocará que aún a bajas concentraciones la actividad sea lo suficientemente alta como para alcanzar rápidamente el equilibrio (reacción A).



**Figura 5.9** Constantes de equilibrio de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico

Por otro lado, en estos sistemas hidrofóbicos, se observa un desplazamiento favorable hacia la producción de diésteres (reacción B) y triésteres (reacción C). En resumen y de acuerdo a la figura 5.9, se observa que el factor determinante en el control de los equilibrios termodinámicos de las reacciones estudiadas es la variación del coeficiente de actividad  $\gamma_i$  determinada por la interacción de los productos con el medio de reacción. Así entonces, la fracción mol de cada producto compensará el cambio de  $\gamma_i$  (positivo o negativo) de manera que se pueda alcanzar en cada caso el valor de la constante de equilibrio de la reacción implicada. Para fines prácticos, esta dependencia deberá permitirnos dirigir un proceso de síntesis específica

de ésteres de polioles hacia un producto en particular a través de la modificación específica del medio de reacción.

Una observación interesante que se deriva de los análisis por HPLC y TLC fué que con el cambio en la polaridad también se modificó la selectividad hacia ciertos isómeros. Por ejemplo, en los análisis de TLC podemos observar que para algunas condiciones los valores de  $R_f$  se modifica, dando como resultado un perfil particular definido en función de la composición del medio de reacción (ver figura 5.6). Este comportamiento se puede explicar por un cambio en la disponibilidad de los radicales OH del xilitol provocado por el medio de reacción empleado. Dicho de otra manera, si suponemos que en un medio hidrofóbico el xilitol tendría pocas interacciones con el disolvente de la reacción, entonces se modificaría la accesibilidad a algunas de las posiciones reactivas, mientras que otras quedarían desfavorecidas. En disolventes menos hidrofóbicos el comportamiento sería inverso, es decir las posiciones accesibles en disolventes hidrofóbicos se verían menos favorecidas. Estas observaciones nos hacen suponer que la selectividad de la reacción puede ser favorecida no solamente en términos del grado de esterificación sino también en términos de las posiciones de esterificación. En conclusión, mediante el estudio del efecto del medio de reacción sobre el tipo de productos obtenidos de la esterificación enzimática del xilitol con el ácido oléico se pudieron establecer las condiciones apropiadas para la síntesis dirigida de monoésteres o bien de ésteres con mayor grado de esterificación.

#### **6.4 Modelamiento Teórico del Sistema de Reacción**

Una vez demostrada la factibilidad de la reacción y el cambio en selectividad de acuerdo al medio de reacción utilizado se propuso modelar el comportamiento de la síntesis enzimática en medios no-convencionales. Este modelamiento consiste en la utilización de actividades termodinámicas para el cálculo de las constantes de equilibrio correspondientes. Como ya se demostró en las secciones anteriores, el equilibrio de la reacción depende de

las actividades termodinámicas de los componentes de la reacción siendo estos parámetros función directa de la naturaleza del medio de reacción.

Como también se discutió en la sección de antecedentes el modelo teórico UNIFAC (UNiversal Function Activity Coefficient) calcula las actividades termodinámicas de los componentes de una solución basándose en las fracciones mol y en las interacciones ocasionadas por los diferentes grupos funcionales de cada uno de los componentes en la solución, incluyendo el disolvente.

Para este efecto, se realizaron diferentes cálculos que nos permitieron confirmar si el modelo teórico representa correctamente el comportamiento observado experimentalmente. Se realizaron los cálculos teóricos de actividades termodinámicas de monoésteres, diésteres y triésteres de xilitol para los diferentes medios de reacción evaluados experimentalmente. En la tabla 5.4 y 5.5 se muestran los valores calculados para los coeficientes y las actividades termodinámicas para los diferentes productos en los medios de reacción empleados en la sección anterior. El cálculo de actividades se realizó considerando diferentes concentraciones 5, 10 y 50 mM para cada uno de los productos, calculando la media y la desviación estándar.

**Tabla 5.4** Coeficientes de actividad termodinámica de monoéster, diéster y triéster de xilitol y ácido oléico para concentraciones 5, 10 y 100 mM en diferentes medios de reacción.

Medio de Reacción	log P	Coeficientes de Actividad Monoésteres		Coeficientes de Actividad Diésteres		Coeficientes de Actividad Triésteres	
		Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estandar
2P/DMSO 80:20	0.36	0.0738	0.0024	0.1265	0.0021	0.5745	0.0100
2B/DMSO 80:20	0.77	0.0825	0.0027	0.1080	0.0027	0.4395	0.0030
2M2P	0.79	0.1602	0.0032	0.1201	0.0024	0.2010	0.0007
2M2B	1.3	0.2475	0.0039	0.1327	0.0031	0.1778	0.0024
2B/Hex 50:50	2.4	0.5458	0.0010	0.0410	0.0024	0.0133	0.0013
hexano	3.5	5959.4667	2813.2837	19.7957	6.8786	0.4045	0.0707

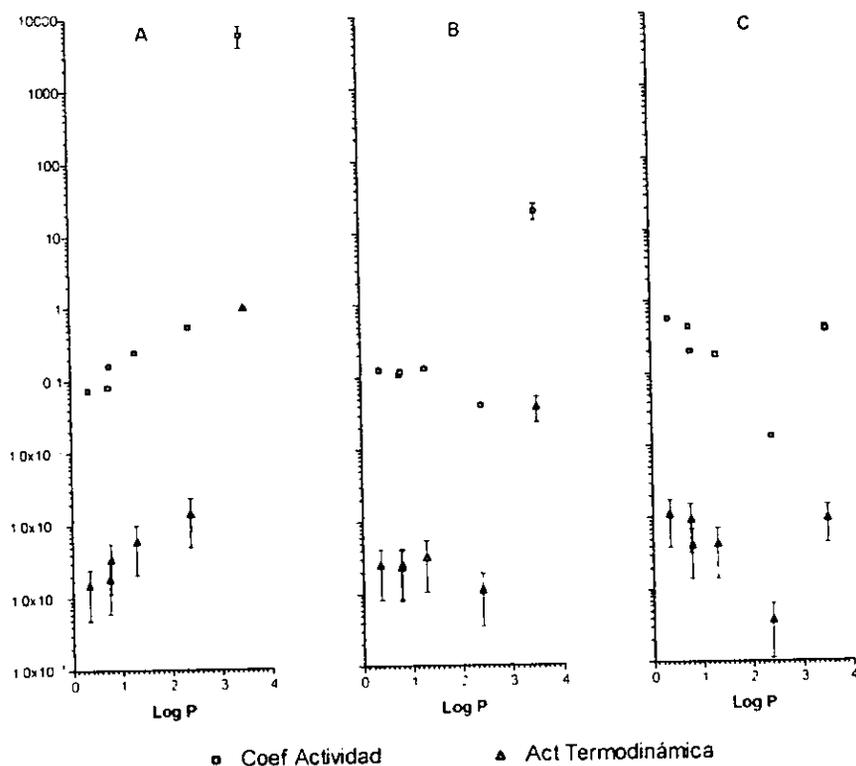
**Tabla 5.5** Actividades termodinámicas de monoéster, diéster y triéster de xilitol y ácido oléico para concentraciones 5, 10 y 100 mM en diferentes medios de reacción.

Medio de Reacción	log P	Actividad Monoésteres		Actividad Diésteres		Actividad Triésteres	
		Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estandar
2P/DMSO 80:20	0.36	0.000146	0.000139	0.000247	0.000232	0.001086	0.000993
2B/DMSO 80:20	0.77	0.000182	0.000174	0.000237	0.000224	0.000935	0.000863
2M2P	0.79	0.000335	0.000316	0.000251	0.000236	0.000413	0.000385
2M2B	1.3	0.000597	0.000561	0.000322	0.000305	0.000428	0.000401
2B/Hex 50:50	2.4	0.001409	0.001305	0.000112	0.000109	0.000038	0.000037
hexano	3.5	1.0	0.0	0.038108	0.021016	0.000962	0.000741

En la tabla 5.5 se muestran los valores correspondientes a las actividades termodinámicas. Podemos observar el efecto producido en cuanto a actividades termodinámicas a diferentes concentraciones y la tendencia en las actividades termodinámicas en diferentes medios de reacción. Así, las actividades para los monoésteres aumenta conforme aumenta la hidrofobicidad del medio y lo contrario para los triésteres y los diésteres cuya actividad disminuye conforme aumenta la hidrofobicidad del medio. Sin embargo, el aumento de actividad es crítico para los productos mas polares como los monoésteres en donde alcanzan valores de actividades mayores comparados con los valores obtenidos para los diésteres y triésteres a concentraciones equivalentes. Lo interesante de estos resultado es la tendencia que se observa en cuanto a aumento en actividades dependiendo de la naturaleza de la molécula y las consecuencias que pudiese traer en reacciones al equilibrio. Debido a que los monoésteres mantienen un coeficiente de actividad menor en medios polares que en hidrofóbicos nos permite alcanzar la actividad al equilibrio a una alta concentración, mientras que en medios de reacción hidrofóbicos alcanzan la actividad al equilibrio con concentraciones relativamente bajas ya que alcanza su valor máximo de 1 a una concentración de 5 mM. Esto nos indica que su síntesis se verá favorecida en medios de reacción polares donde el medio les permite tener

una baja actividad a concentraciones altas. En cambio, para los triésteres, se observa el efecto inverso, coeficientes de actividad bajos en medios hidrofóbicos. Esto permite que se alcance una alta concentración para la actividad al equilibrio y por ende su síntesis se verá favorecida en este tipo de medios.

En la figura 5.10 se presenta la tendencia de los coeficientes de actividad y actividades termodinámicas de monoésteres, diésteres y triésteres en función del log P de los disolventes estudiados en esta sección para concentraciones 5, 10 y 50 mM de cada componente.



**Figura 5.10** Influencia de la hidrofobicidad del medio de reacción sobre las actividades termodinámicas de monoéster (A), diéster (B) y triéster (C) de xilitol y ácido oléico a concentraciones 5, 10 y 50 mM.

En esta figura se puede observar que el cambio en actividades aun utilizando una escala logarítmica es muy drástico para los diferentes valores de log P utilizados. Como ya se mencionó anteriormente, la polaridad del medio no es el unico factor que modifica las actividades, también se debe tomar en cuenta la estructura del disolvente utilizado. Como se puede observar en la figura 5.10, los coeficientes de actividades de monoésteres, diésteres y triésteres varían para valores iguales de log P. Esto nos hace suponer que para log P iguales y estructuras diferentes el coeficiente de actividad se verá modificada en función de la afinidad estructural y de las posibles interacciones sustrato-producto-disolvente que se puedan realizar. Otra observación que se deriva de la figura 5.10 es que los coeficientes de actividad, para diferentes concentraciones prácticamente no varía, sin embargo las actividades termodinámicas para diferentes concentraciones varía considerablemente. Esto demuestra que los coeficientes de actividad son función principalmente de las interacciones estructurales, mientras que las actividades termodinámicas dependen de las concentraciones en solución. Mediante el modelo teórico UNIFAC se pueden predecir los cambios en actividad de cada uno de los componentes de la reacción al cambiar el medio de reacción y así conocer cuales serían los productos mayoritarios. Si se conocen las variables termodinámicas que caracterizan a la reacción (constantes de equilibrio) se puede desarrollar un algoritmo de solución que calcule las concentraciones al equilibrio basandose en cálculos de actividades termodinámicas. Una vez llevado a cabo el modelamiento, condiciones como la hidrofobicidad o la naturaleza estructural del medio pueden ser modificadas de tal forma que se favorezca la síntesis de cierto producto en particular.

### **6.5 Estudio de la Cinética de Reacción en 2-Metil-2-Butanol (2M2B)**

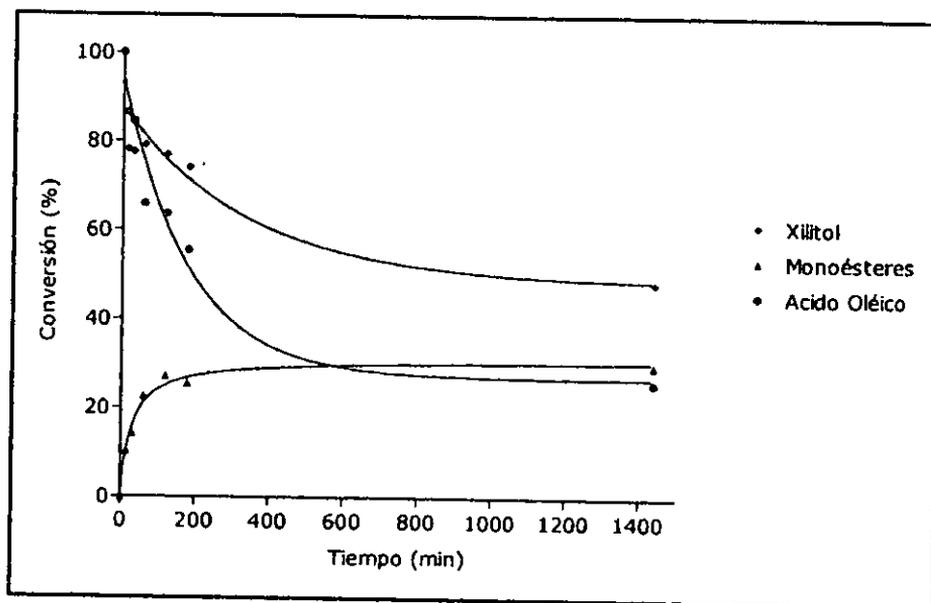
Con el propósito de estudiar en detalle el perfil cinético de las reacciones de síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico se analizaron muestras de reacción efectuadas en un medio de 2-metil-2-butanol (2M2B).

Se eligió este disolvente como medio de reacción por presentar buenos rendimientos de reacción en términos de monoésteres y por ser un disolvente compatible con aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Bousquet 1999).

Se tomaron muestras con diferentes avances de reacción para poder observar el comportamiento de la reacción a través del tiempo. Las muestras fueron analizadas mediante las técnicas de TLC y HPLC descritas anteriormente.

Las cinéticas de reacción fueron cuantificadas en su totalidad en términos del consumo de xilitol y ácido oléico y de la formación de monoésteres. Los diésteres y triésteres se cuantificaron en conjunto por diferencia en el balance de reacción solo para las posiciones al equilibrio. Se cuantificó el xilitol, el ácido oléico y los monoésteres con muestras estandares comerciales y productos de purificación.

Los resultados de la cinética estudiada se presenta en la figura 5.11.



**Figura 5.11** Cinética de reacción para la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.

Como se puede observar, la concentración de sustratos disminuye de manera unimolecularmente conforme avanza la reacción. El equilibrio para la primera reacción, la producción de monoéster, es alcanzado en 240 min, mientras que el equilibrio para la desaparición de los sustratos se alcanza 11 horas después. Esto indica que la velocidad de formación de los monoésteres es superior que para los demás productos de reacción (diésteres y triésteres). En la misma figura observamos que la pendiente correspondiente a la formación de monoésteres después de transcurridas 4 hrs. de reacción es prácticamente cero, mostrando que la formación de estos productos alcanzó el equilibrio. En cambio, las pendientes de xilitol y ácido oléico después de transcurridas las primeras 4 hrs. son diferentes a cero, mostrando una disminución importante en su concentración. Esta disminución en la concentración de los sustratos se debe principalmente a la producción de diésteres y triésteres. Dicho de otra manera, a pesar de que se alcanzó rápidamente el equilibrio para la síntesis de monoésteres, estos continúan produciéndose, sin embargo rápidamente reaccionan para la formación de diésteres y triésteres sin que se perciba un cambio en la concentración de monoésteres. De esta forma podemos suponer que el medio de reacción determina la concentración máxima de productos como los monoésteres, los cuales una vez alcanzado el equilibrio (actividad al equilibrio) su concentración no se ve modificada a través del tiempo.

En términos de conversiones, se observa para las condiciones de reacción estudiadas una conversión final para xilitol cercana al 50% y para ácido oléico superior al 70%. En la tabla 5.6 se presentan los valores correspondientes a las concentraciones al equilibrio de los sustratos y los productos de reacción, así como su correspondiente conversión.

**Tabla 5.6** Cuantificación al equilibrio para sustratos y productos de la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico.

	Concentración (mM)	Conversión (%)
<b>Xilitol</b>	20.74	51.60
<b>Acido Oléico</b>	12.22	74.13
<b>Monoésteres de Xilitol</b>	12.80	29.86
<b>Diésteres de Xilitol</b>	5.71	26.66
<b>Triésteres de Xilitol</b>	3.60	25.20

En esta tabla se puede observar que el producto mayoritario para la reacción estudiada son los monoésteres de xilitol, los cuales alcanzan una conversión de formación del 30%, los demás productos fueron cuantificados mediante diferencia en el balance general para las posiciones del equilibrio obteniendo una conversión para la formación de diésteres de un 26% aproximadamente y una conversión de formación para los triésteres del 25% aproximadamente. Las concentraciones al equilibrio para los diésteres y triésteres fueron calculadas tomando en cuenta las moles utilizadas de xilitol y ácido oléico para la formación de monoésteres, las demás moles convertidas corresponden a la formación de diésteres y triésteres.

De esta forma, las concentraciones máximas posibles para cada grado de esterificación son 50 mM, 25 mM y 17 mM respectivamente. Como se mencionó anteriormente el 2M2B permite una producción mayoritaria de monoésteres debido a que su polaridad permite que los monoésteres se acumulen en el medio de reacción y a que tengan una baja actividad a concentraciones altas.

La cinética de reacción mostrada en esta sección nos permite observar la aplicación que podría tener este sistema de reacción a niveles de producción industriales. Los principales productos de interés de la reacción de síntesis de ésteres de xilitol siendo los monoésteres debido al interés particular por este tipo de productos en la industria farmacéutica y alimentaria. Así, se considera que mediante este sistema de reacción es posible obtener como producto mayoritario de reacción a los monoésteres. El objetivo inmediato sería un aumento en los rendimientos particulares en monoésteres. Para

llevar a cabo esta mejora en el rendimiento, una primera posibilidad consistiría en la utilización de medios más polares al 2M2B que nos permitieran una síntesis elevada de monoésteres. En la sección anterior se utilizaron mezclas de disolventes compuestas por alcoholes terciarios y DMSO, un disolvente muy polar, para aumentar el rendimiento de los monoésteres, sin embargo los resultados no fueron los esperados. Existen otro tipo de disolventes mas polares que el 2M2B como las glicinas, la piridina y la dimetilformamida (DMF), los cuáles podrían permitir una mayor producción de monoésteres en el medio de reacción.

El segundo método, y probablemente el mas viable técnicamente consistiría en la recuperación del producto de interés, en este caso los monoésteres, mediante adsorción a un soporte sólido externo al medio de reacción. Este método fué propuesto para la recuperación de monoésteres de glicerol (monooleina) y consiste en fluir el medio de reacción a través de una columna empacada con sílica gel adsorbiendo selectivamente los monoésteres (Castillo et al 1998). Esta alternativa de recuperación permitiría al mismo tiempo una disminución en la concentración al equilibrio de monoésteres de xilitol en el medio de reacción y en consecuencia un desplazamiento favorable del equilibrio de formación de monoésteres.

Un tercer método consistiría en el empleo de mayores concentraciones de alguno de los sustratos para crear un medio de reacción en el cuál la producción de monoésteres se vea favorecida mediante desplazamientos del equilibrio hacia la formación del monoéster. Debido a que el xilitol solo participa en la reacción de formación de monoésteres, si la concentración inicial de xilitol en el medio de reacción es mayor, al igual que en el método anterior, habrá un desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la formación del monoéster. Esta hipótesis fué estudiada en la siguiente sección modificando las relaciones estequiométricas xilitol-ácido oléico

### **6.6 Estudio de las Relaciones Estequiométricas Xilitol-Acido Oléico**

En la parte inicial del proyecto se mantuvo la relación xilitol-oléico equimolar ya que estas condiciones permiten estudiar el consumo de

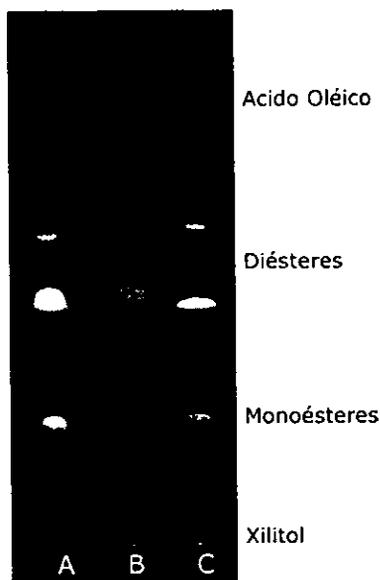
sustratos y la formación de productos desde un punto de vista cinético y de equilibrio termodinámico. En esta parte del proyecto se analizó el efecto producido por una relación no-equimolar de los sustratos implicados en las reacciones sobre la selectividad de las reacciones estudiadas. En este contexto se decidió evaluar que efecto predomina en la selectividad de la reacción en términos del grado de esterificación de los productos sintetizados. Es decir, por un lado en función de la naturaleza del medio de reacción y por otro lado en función del efecto de la relación estequiométrica entre las especies involucradas. Mediante la utilización de diferentes relaciones estequiométricas entre los sustratos se supone observar el posible cambio en el equilibrio de la reacción hacia una mayor formación de algún producto en particular debido a los desplazamientos del equilibrio. Como se mencionó en la sección anterior, una concentración inicial de xilitol mayor a la de ácido oléico podría desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del monoéster, debido a que es la única reacción en la que participa el xilitol.

Con este propósito se realizaron reacciones con diferentes relaciones molares xilitol/ácido oléico (1/1, 1/5, 5/1). Las reacciones fueron efectuadas en las condiciones descritas para el estudio cinético, con la diferencia que la cantidad de sustrato varía según la relación xilitol/ácido oléico que se haya empleado. En la tabla 5.7 se muestran las concentraciones y las cantidades de sustratos empleadas para las diferentes reacciones efectuadas en este estudio.

**Tabla 5.7** Relaciones estequiométricas empleadas en la síntesis de ésteres de xilitol y ácido oléico.

Relación Molar	Xilitol		Acido Oléico	
	Cantidad (mg)	Concentración (mM)	Cantidad (mg)	Concentración (mM)
1/1	76	50	141	50
1/5	76	50	705	250
5/1	380	250	141	50

Posteriormente, las reacciones fueron analizadas cualitativamente después de 48 hrs de reacción mediante la técnica de TLC. En la figura 5.12 se ilustra el análisis realizado por esta técnica.



**Figura 5.12** Influencia de la relación xilitol/ácido oléico sobre la síntesis enzimática de ésteres de xilitol y ácido oléico en 2M2B. A: 1/1; B: 5/1; C: 1/5.

Como podemos observar en la figura 5.12 las conversiones finales para sustratos y productos (proporciones) en el equilibrio no variaron para las diferentes relaciones de sustratos empleadas. Cabe mencionar que las concentraciones iniciales para cada reacción son diferentes, lo que significa que observar mayor cantidad de producto no significa una mayor conversión, ya que ésta es función de las concentraciones iniciales de los sustratos.

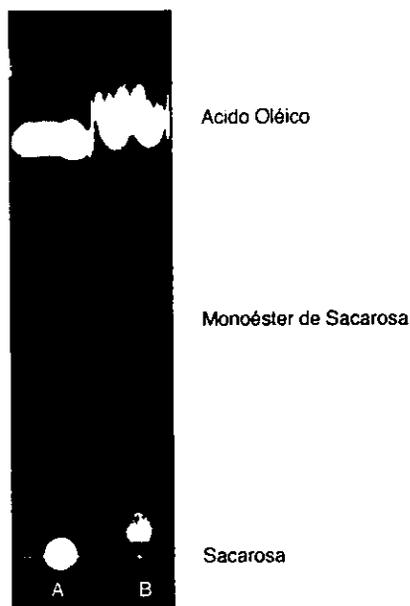
Estos resultados nos hacen pensar que el equilibrio de la reacción no es determinado por las variables cinéticas, sino por las variables termodinámicas. Es decir, las concentraciones iniciales de los sustratos no determinan las condiciones del equilibrio, sino las actividades termodinámicas, las cuales presentan en general pequeñas variaciones al modificarse las concentraciones iniciales.

Una vez estudiado el efecto sobre la selectividad de la reacción debido a diferentes relaciones estequiométricas de los sustratos se puede concluir que este método no permitiría la obtención selectiva de una mayor conversión de monoésteres como se planteó en la sección anterior. Habría que analizar la productividad de las diferentes relaciones estequiométricas utilizadas para observar si la producción de monoésteres se puede llevar a cabo de manera más eficiente, acortando el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de reacción, aún cuando su rendimiento con respecto a las demás relaciones molares no sea mejorado.

### **6.7 Reacciones con Sacarosa**

Finalmente, con el propósito de ampliar las aplicaciones de las reacciones de síntesis enzimática a la síntesis de ésteres de otros polioles en medios orgánicos se realizaron reacciones de esterificación entre la sacarosa y el ácido oléico. La sacarosa tiene tres radicales hidroxilos primarios, uno más que el xilitol, lo que aumenta las posibles posiciones de esterificación. En total la sacarosa cuenta con ocho radicales OH en su molécula, pero no todos son igual de susceptibles a reaccionar debido a que cuenta con tres radicales OH primarios y el resto son secundarios, por lo que serán más susceptibles los primarios para la formación de enlaces éster. El problema que presenta este sustrato es su polaridad lo cual provoca una fuerte disminución en la solubilidad en disolventes orgánicos. Para resolver los problemas de insolubilidad se propuso inmovilizar la sacarosa en sílica gel de acuerdo al método reportado por Castillo et. al. (Castillo et al 1994) para la inmovilización de glicerol en reacciones de esterificación con ácido oléico. La técnica consistió en la adición de 1 g. de sílica gel a una solución saturada de sacarosa en metanol. La solución se mantuvo en agitación constante a 50°C hasta observar una mezcla homogénea. El disolvente se extrajo mediante evaporación en un rotavapor hasta obtener un polvo homogéneo. La concentración de sacarosa se calculó considerando que un gramo de la mezcla sacarosa-sílica gel está compuesto en un 50 % w/w por sacarosa.

Se realizaron reacciones a concentraciones equimolares de ambos sustratos y las condiciones de concentración empleadas en los estudios con xilitol. Estas reacciones fueron analizadas cualitativamente mediante la técnica de cromatografía en placa fina (TLC) descrita anteriormente. Debido a la falta de estándares de productos y de técnicas cromatográficas desarrolladas para el análisis de los ésteres de sacarosa no se realizó el análisis cuantitativo. Los resultados mostrados en la figura 5.13 confirman la formación de ésteres de sacarosa con la detección de productos con la técnica de TLC.



**Figura 5.13** Análisis de TLC de la síntesis enzimática de ésteres de sacarosa (50mM) y ácido oléico (50mM). A: Tiempo Inicial  
B: Tiempo Final

Como se puede observar en la figura en estas reacciones se obtuvo una baja conversión de sacarosa y ácido oléico pero se logró detectar la formación exclusiva de monoésteres. Los bajos rendimientos alcanzados en estas reacciones se debe a la poca disponibilidad (solubilidad) que tiene la sacarosa en medios orgánicos.

También se realizaron reacciones de esterificación pero sin la inmovilización de la sacarosa en sílica gel para observar la posibilidad de reacción estando la sacarosa insoluble en el medio de reacción. En estos experimentos no se logró detectar la formación de ningún producto debido a que la solubilidad de la sacarosa es prácticamente cero para el medio de reacción empleado. Como se mencionó en la sección de antecedentes una alternativa propuesta por Arcos et. al. (Ferrer et al 1999) para la síntesis de ésteres de sacarosa consiste en la adición de un co-solvente polar al medio de reacción de tal forma que la disponibilidad de la sacarosa aumente en el medio de reacción. Sin embargo, los resultados reportados por este grupo de investigación son similares a los obtenidos mediante la inmovilización de la sacarosa, lo cual demuestra la eficacia del método de pseudosolubilización empleado (adsorción en gel de sílica)

De acuerdo a los resultados presentados, la síntesis enzimática de ésteres de xilitol puede ser llevada a cabo con otros polioles, en este caso la sacarosa. Los rendimientos alcanzados para la síntesis de ésteres de sacarosa no son iguales a los obtenidos para los ésteres de xilitol debido principalmente a la diferencias estructurales en ambos polioles. En efecto, estas diferencias estructurales modifican la polaridad de los polioles de tal forma que modifican su solubilidad en disolventes orgánicos. Sin embargo existen técnicas como la inmovilización en sílica gel o el uso de cosolventes polares en el medio de reacción las cuales nos permitirían superar los problemas de insolubilidad de los polioles.

## 7 Conclusiones

1. Se establecieron las condiciones de reacción para la obtención de ésteres de xilitol y ácido oléico mediante reacciones de hidrólisis inversa en medios de reacción no convencionales.
2. Se estudiaron las variables que modifican la selectividad de la reacción, principalmente la hidrofobicidad del medio de reacción a fin de dirigir la síntesis selectiva de los productos en base al grado de esterificación. De esta forma se obtuvo la formación selectiva de monoésteres de xilitol en 73% de las moles totales de productos formados al utilizar 2M2P/DMSO 80:20 (v/v) como medio de reacción y la síntesis mayoritaria de diésteres y triésteres (94%) en medios de reacción hidrofóbicos como hexano.
3. Se compararon los resultados experimentales con el modelo teórico UNIFAC y se explicó el comportamiento de las actividades termodinámicas de los componentes de la reacción al modificarse la hidrofobicidad del medio de reacción. Estos datos teóricos, comparados con los experimentales explican la síntesis mayoritaria en medios de reacción polares y de diésteres y triésteres en medios de reacción hidrofóbicos.
4. Dentro de este proyecto también se estudió el perfil cinético de las reacciones de síntesis de ésteres de xilitol y ácido oléico en 2M2B. Se observó que la formación de monoésteres alcanza el equilibrio en 4 hrs. El equilibrio para las demás reacciones de síntesis es alcanzado 11 hrs después. En términos de conversión se obtuvieron los siguientes resultados: xilitol (50%), ácido oléico (75%), monoésteres de xilitol (39%), diésteres (36%) y triésteres (25%).
5. Se estableció la síntesis enzimática en medios no convencionales con la utilización de otro poliol (sacarosa) mediante la inmovilización en gel de sílica.
6. El cambio de las relaciones molares iniciales de sustratos no modificó de manera selectiva el perfil de productos y se determinó que este depende de las actividades termodinámicas y no de las concentraciones.
7. Este trabajo propone la síntesis de agentes emulsificantes mediante procesos enzimáticos en disolventes orgánicos. Este proceso ofrece como

ventajas técnicas condiciones de reacción a bajas temperaturas y presión atmosférica lo cual involucra una reducción en gastos energéticos, menores procesos de purificación debido al aumento en selectividad de acuerdo al medio de reacción, tiempos cortos de reacción (15 hrs), reducción de gastos en materia prima con la utilización de sustratos renovables y abundantes.

## 8 Perspectivas

Mediante las técnicas presentadas en este trabajo es posible la obtención de ésteres de xilitol-ácido oléico y sacarosa-ácido oléico mediante síntesis enzimática en medios no-convencionales. Sin embargo las tareas de investigación deben seguir para determinar otros parámetros que afecten la síntesis enzimática, además de la optimización de las condiciones de reacción a fin de obtener una mayor selectividad en la reacción. A continuación se enumeran algunos aspectos del proyecto que sería interesante investigar a fondo:

1. Purificación total de los productos con mayor grado de esterificación (diésteres y triésteres) para su cuantificación. Esto nos permitiría conocer la concentración de todos los componentes de la reacción. Una vez que se cuenta con las concentraciones de cada especie se podrían calcular las variables cinéticas (velocidad de reacción y constante de equilibrio) de las diferentes reacciones implicadas para un mejor conocimiento del comportamiento de las reacciones en el transcurso del tiempo y en condiciones de equilibrio.
2. El uso de disolventes aún más polares que los utilizados en este trabajo podrían ser empleados para una mayor selectividad hacia la formación de monoésteres. Se debe tener cuidado con la elección del disolvente a utilizar como medio de reacción debido a que no solo la polaridad del medio de reacción influencia la selectividad sino también la estructura del disolvente a través de la capacidad de interactuar con los componentes de la reacción.
3. El uso de herramientas como el cálculo de actividades termodinámicas ofrece una alternativa en el estudio de reacciones enzimáticas en medios no-convencionales mediante la estimación de los coeficientes de actividad para las especies involucradas en el medio de reacción. Esto permite una mejor selección de las condiciones de reacción a fin de optimizar la selectividad y la conversión de las reacciones de síntesis enzimática. Mediante esta herramienta y el conocimiento de las variables cinéticas de

cada reacción se puede realizar un algoritmo de solución que evalúe las condiciones que afectan las variables termodinámicas del proceso a fin de conocer *a priori* valores aproximados en las condiciones finales de reacción (conversión y selectividad de la reacción).

4. Generalizar este sistema de reacción a una amplia gama de polioles, desde dioles hasta carbohidratos complejos.

## 9 Anexo A Método UNIFAC

El método UNIFAC para evaluar los coeficientes de actividad se basa en el concepto de que una mezcla líquida debe considerarse como una solución de unidades estructurales a partir de las cuales se han formado las moléculas, más que una solución de las propias moléculas. Esas unidades estructurales reciben el nombre de *subgrupos*. La gran ventaja de UNIFAC es que un número de subgrupos relativamente pequeño se combina para formar un número muy grande de moléculas.

El método UNIFAC se basa en la ecuación UNIQUAQ, cuyos coeficientes de actividad se obtienen de la siguiente ecuación:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^C + \ln \gamma_i^R$$

$$\ln \gamma_i^C = 1 - J_i + \ln J_i - 5q_i \left( 1 - \frac{J_i}{L_i} + \ln \frac{J_i}{L_i} \right)$$

y

$$\ln \gamma_i^R = q_i (1 - \ln L_i) - \sum_k \left( \theta_k \frac{S_{ki}}{\eta_k} - G_{ki} \ln \frac{S_{ki}}{\eta_k} \right)$$

donde

$$J_i = \frac{r_i}{\sum_j r_j x_j}$$

$$L_i = \frac{q_i}{\sum_j q_j x_j}$$

$$r_i = \sum_k v_k^{(i)} R_k$$

$$q_i = \sum_k v_k^{(i)} Q_k$$

$$G_{ki} = v_k^{(i)} Q_k$$

$$\theta_k = \sum_i G_{ki} x_i$$

$$S_{ki} = \sum_m G_{mi} \tau_{mk}$$

$$\eta_k = \sum_i S_{ki} x_i$$

y

$$\tau_{mk} = \exp \frac{-a_{mk}}{T}$$

Los subíndices  $i, v$  identifica los compuestos y  $j$  es un índice de unión que opera sobre todos los componente. El subíndice  $k$  identifica los subgrupos y  $m$  es un índice de unión que opera sobre todos los subgrupos. La cantidad  $v_x^{(i)}$  es el número de subgrupos del tipo  $k$  en una molécula del componente  $i$ . Los valores de los parámetros de subgrupos  $R_k$  y  $Q_k$  y de los parámetros de interacción de grupos  $a_{mk}$  se encuentran tabulados en la literatura.

## 8 Bibliografía

- Adachi, S., Nagae, K., and Matsuno, R. (1999)  
Lipase-Catalyzed Condensation of Erythritol and Medium-Chain Fatty Acids in Acetonitrile With Low Water Content.  
*J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, 6, 21-27.
- Adlercreutz, P. (1994)  
Biocatalysis in Non-conventional Media.  
In *Applied Biocatalysis*, Cabral, J., Harwood Academic Publishers, U.S.A., First Edition, 279-298.
- Akoh, C. C. (1994)  
Enzymatic Synthesis of Acetylated Glucose Fatty Acid Esters in Organic Solvent.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 3, 319-323.
- Akoh, C. C. (1995)  
Lipid-Based Fat Substitutes.  
*Critic. Rev. Food Sci. Nutrition*, 35, 5, 405-430.
- Akoh, C. C. and Mutua, L. N. (1994)  
Synthesis of Alkyl Glycoside Fatty Acid Esters: Effect of Reaction Parameters and the Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 16, 115-119.
- Akoh, C. C. and Nwosu, C. V. (1992)  
Emulsification Properties of Polyesters and Sucrose Ester Blends II: Alkyl Glycoside Polyesters.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1, 14-19.
- Arcos, J. A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998a)  
Different Strategies for Selective Monoacylation of Hexoaldoses in Acetone.  
*Journal of Surfactants and Detergents*, 1, 3, 345-352.
- Arcos, J. A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998b)  
Quantitative Enzymatic Production of 1,6-Diacyl Fructofuranoses.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 22, 27-35.
- Arcos, J. A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998c)  
Quantitative Enzymatic Production of 1,6-Diacyl Sorbitol Esters.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 60, 1, 53-60.
- Arcos, J. A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998d)  
Quantitative Enzymatic Production of 6-O-Acylglucose Esters.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 57, 5, 505-509.

- Arroyo, M., Sánchez-Montero, J. M, and Sinisterra, J. V. (1999)  
Thermal Stabilization of Immobilized Lipase B From *Candida antarctica* on Different Supports: Effect of Water Activity in Organic Media.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 24, 3-12.
- Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partridge, J., and Rees, D. G. (1995)  
Biocatalyst Behaviour in Low-Water Systems.  
*Tibtech*, 13, 468-473.
- Bellot, J. C., Choisnard, L., Castillo, R. E., and Marty, A. (1998)  
Combining Solvent Engineering and Thermodynamic Modelling to Enhance Selectivity During Monoglyceride Synthesis by Lipase-Catalized Esterification.  
*En Prensa*,
- Bousquet, M., Willemot, R., Monsan, P., and Boures, E. (1999)  
Enzymatic Synthesis of Unsaturated Fatty Acid Glucoside Esters for Dermo-Cosmetic Applications.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 63, 6, 730-736.
- Cao, L., Bornscheuer, U., and Schmid, R (1999)  
Lipase-Catalyzed Solid-Phase Synthesis of Sugar Esters. Influence of Immobilization on Productivity and Stability of the Enzyme.  
*J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, 6, 279-285.
- Castillo, R. E., Dossat, V., Combes, D., and Marty, A. (1998)  
Efficient Lipase-Catalyzed Production of Tailor-Made Emulsifiers Using Solvent Engineering Coupled to Extractive Processing.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 2, 309-313.
- Castillo, R. E., Dossat, V., Marty, A., Condoret, J. S., and Combes, D. (1997)  
The Role of Silica Gel in Lipase Catalysed Esterification Reactions of High Polar Substrates.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 2, 77-86.
- Castillo, R. E., Marty, A., Combes, D., and Condoret, J. S. (1994)  
Polar Substrates for Enzymatic Reactions in Supercritical CO<sub>2</sub>: How to Overcome the Solubility Limitation.  
*Biotechnol. Lett.*, 16, 2, 169-174.
- Chand, S., Adlercreutz, P., and Mattiasson, B. (1997)  
Lipase-Catalyzed Esterification of Ethylene Glycol to Mono- and Diesters. The Effect of Process Parameters on Reaction Rate and Product Distribution.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 20, 102-106.

- Chandler, I., Quinlan, P., and McNeill, G. (1998)  
Lipase-Catalyzed Synthesis of Chiral Triglycerides.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 11, 1513-1518.
- Coulon, D., Girardin, M., and Ghoul, M. (1999)  
Enzymic Synthesis of Fructose Monooleate in a Reduced Pressure Pilot Scale Reactor Using Various Acyl Donors.  
*Process Biochem.*, 34, 913-918.
- Cserháti, T. and Forgács, E. (1997)  
Separation and Quantitative Determination of Non-Ionic Surfactants Used As Pesticid Additives.  
*J. Chromatogr. A.*, 774, 265-279.
- Degn, P., Pedersen, L., Duus, J., and Zimmermann, W. (1999)  
Lipase-Catalysed Synthesis of Glucose Fatty Acid Esters in *tert*-Butanol.  
*Biotechnol. Lett.*, 21, 275-280.
- Dordick, J. S. (1989)  
Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic Solvents.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 11, 4, 194-210.
- Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., and Lortie, R. (1995)  
Enzymatic Preparation of Biosurfactants From Sugar or Sugar Alcohols and Fatty Acids in Organic Media Under Reduced Pressure.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 48, 3, 214-221.
- Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., and Lortie, R. (1996)  
Characterization of Enzymatically Prepared Biosurfactants.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1, 109-113.
- Ergan, F., Trani, M., and André, G. (1990)  
Production of Glycerides From Glycerol and Fatty Acid Immobilized Lipases in Non-Aqueous Media.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 35, 1, 195-200.
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Bernabé, M., Ballesteros, A., and Plou, F. J. (1999)  
Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 65, 1, 10-16.
- Fiechter, A. (1992)  
Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application.  
*Trends Biotechnol.*, 10, 6, 208-217.

Flores, M. V., Sewalt, J. J. W., Jan, Janssen, A., and Van der Padt, A. (1999)  
The Nature of Fatty Acid Modifies the Equilibrium Position in the Esterification  
Catalyzed by Lipase.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 67, 3, 364-371.

Fregapane, G., Sarney, D. B., Greenberg, S. G., Knight, D. J., and  
Vulfson, E. N. (1994)  
Enzymatic Synthesis of Monosaccharide Fatty Acid Esters and Their Comparison  
With Conventional Products.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1, 87-91.

Gandhi, N. N. (1997)  
Application of Lipases.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 6, 621-634.

García-Alles, L. and Gotor, V. (1998)  
Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Media: Solvent Effects on  
Equilibrium and Individual Rate Constants.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 59, 6, 684-694.

Godfrey, T. & West, S. (1996)  
Industrial Enzymology.  
Stockton Press, New York U.S.A, Second Edition, 285-291

Gunstone, F. D. (1998)  
Movements Towards Tailor-Made Fats.  
*Prog. Lipid Res.*, 37, 5, 277-305.

Gunstone, F. D. (1999)  
Enzymes As Biocatalysts in the Modification of Natural Lipids.  
*J. Sci. Food. Agr.*, 79, 1535-1549.

Halling, P. J. (1992)  
Salt Hydrates for Water Activity Control With Biocatalysts in Organic Media.  
*Biotechnol. Lett.*, 6, 3, 271-276.

Halling, P. J. (1994)  
Thermodynamic Predictions for Biocatalysis in Nonconventional Media: Theory,  
Tests, and Recommendations for Experimental Design and Analysis.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 16, 178-206.

Han, J., Yang, T., and Rhee, J. (1998)  
Optimization of Reaction Variables for Sucrose Monoester Production Using Lipase in  
a Solvent Free System by Taguchi's Method.  
*Biotechnol. Tech.*, 12, 4, 295-299.

Hathcox, A. K. and Beuchat, L. R. (1996)  
Inhibitory Effects of Sucrose Fatty Acid Esters, Alone and in Combination With Ethylenediaminetetraacetic Acid and Other Organic Acids, on Viability of *Escherichia coli* O157:H7.  
*Food Microbiol.*, 13, 213-225.

Ikeda, I. and Klibanov, A. M. (1993)  
Lipase-Catalyzed Acylation of Sugars Solubilized in Hydrophobic Solvents by Complexation.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 42, 6, 788-791.

Jaeger, K. and Riva, S. (1998)  
Microbial Lipases From Versatile Tools for Biotechnology.  
*Tibtech*, 16, 396-403.

Janssen, A., Van der Padt, A., Van Sonsbeek, and Vant Rie (1993)  
The Effect of Organic Solvents on the Equilibrium Position of Enzymatic Acylglycerol Synthesis.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1, 95-103.

Klibanov, A. M. (1986)  
Enzymes That Work in Organic Solvents.  
*CHEMTECH*, 6, 354-359.

Klibanov, A. M., Samokhin, G., Martinek, K, and Berezin, I. (1977)  
A New Approach to Preparative Enzymatic Synthesis.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1351-1361.

Leitgeb, M. and Knez, Z. (1990)  
The Influence of Water on the Synthesis of *n*-Butyl Oleate by Immobilized *Mucor miehei* Lipase.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 11, 775-778.

Lortie, R. (1997)  
Enzyme Catalyzed Esterification.  
*Biotechnol. Adv.*, 15, 1, 1-15.

Maag, H. (1984)  
Fatty Acid Derivatives: Important Surfactants for Household, Cosmetic and Industrial Purposes.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1, 2, 259-267.

Mattson, F. H. and Volpenhein, R. A. (1962)  
Synthesis and Properties of Glycerides.  
*Lipid Res.*, 3, 3, 281-296.

- Mensah, P., Gainer, J. L., and Carta, G. (1998)  
 Adsorptive Control of Water in Esterification With Immobilized Enzymes: I. Batch Reactor Behavior.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 60, 4, 434-444.
- Mohapatra, S. and Hsu, J. (1999)  
 Optimizing Lipase Activity, Enantioselectivity, and Stability With Medium Engineering and Immobilization for Beta-Blocker Synthesis.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 64, 2, 213-220.
- Monk, J. D., Beuchat, L. R., and Hathcox, A. K. (1996)  
 Inhibitory Effects of Sucrose Monolaurate, Alone and in Combination With Organic Acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 81, 7-18.
- Osipow, Ll., Dee Snell, F., York, C. W., and Finchler, A. (1956)  
 Fatty Acid Esters of Sucrose.  
*Ind. Eng. Chem.*, 48, 9, 1459-1464.
- Osipow, Ll., Rosenblatt, W., and Snell, F. D. (1966)  
 Micro-Emulsion Process for the Preparation of Sucrose Esters.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*,
- Parajó, J. C., Domínguez, H., and Domínguez, J. M. (1998)  
 Biotechnological Production of Xylitol. Part 1: Interest of Xylitol and Fundamentals of Its Biosynthesis.  
*Bioresource Technol.*, 65, 191-201.
- Parajó, J. C., Sjursnes, B., Vakurov, A., and Halling, P. J. (1997)  
 Xylitol Production From *Eucalyptus* Wood Hydrolysates Extracted With Organic Solvents.  
*Process Biochem.*, 32, 7, 599-604.
- Pepin, P. and Lortie, R. (1999)  
 Influence of Water Activity On the Enantioselective Esterification of (R,S)-Ibuprofen by *Candida antarctica* Lipase B in Solventless Media.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 63, 4, 502-505.
- Peterson, J. K., Harrison, H. F., and Chortyk, O. T. (1997)  
 Effects of Various Synthetic Sucrose Esters on Weed Seed Germination and Crop Growth: Structure-Activity and Dose-Response Relationships.  
*J. Agric. Food Chem.*, 45, 12, 4833-4837.

Plou, F. J., Cruces, M. A., Pastor, E., Ferrer, M., Bernabé, M., and Ballesteros, A. (1999)

Acylation of Sucrose With Vinyl Esters Using Immobilized Hydrolases: Demonstration That Chemical Catalysis May Interfere With Enzymatic Catalysis. *Biotechnol. Lett.*, 21, 635-639.

Pouillart, P., Douillet, O., Scappini, B., ozzini A., Santini, V., ossi A , Paglia, G., Strippoli, P., Rigacci, L, Ronco, G., and Villa, P. (1998)

Regioselective Synthesis and Biological Profiling of Butyric and Phenylalkylcarboxylic Esters Derivated Form D-Mannose and Xylitol: Influence of Alkyl Chain Length on Acute Toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 7, 93-106.

Preziosi-Belloy, L., Nollet, V., and Navarro, J. M. (2000)

Xylitol Production From Aspenwood Hemicellulose Hydrolisate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.*, 22, 239-243.

Reyes, D. D., Castillo, R. E., Barzana, E., and Lopez-Munguía, A (2000)

Capsaicin Hydrolysis by *Candida antarctica* Lipase. *Biotechnol. Lett.*, En Prensa,

Riva, S. and Secundo, F. (1990)

Selective Enzymatic Acylations and Deacylations of Carbohydrates and Related Compounds. *Chimicaoggi*, 9-16.

Schmid, U., Bornscheuer, U., Soumanou, M., McNeill, G., and Schmid, R (1998)  
Optimization of the Reaction Conditions in the Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Triglycerides.

*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 11, 1527-1531.

Schmid, U., Bornscheuer, U., Soumanou, M., McNeill, G., and Schmid, R (1999)

Highly Selective Synthesis of 1,3-Oleoyl-2-Palmitoylglycerol by Lipase Catalysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 6, 678-684.

Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T., and Inamasu, S. (1984)

Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters of Fatty Acid (1) Esterification of Sucrose, Glucose, Fructose and Sorbitol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 11, 1761-1765.

Selmi, B., Gontier, E., Ergan, F., and Thomas, D. (1998)

Effects of Fatty Acid Chain Length and Unsaturation Number on Truglyceride Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipase in Solvent-Free Medium. *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 182-186.

- Silva, S., Roberto, I., Felipe, M., and Mancilha, I. (1996)  
Batch Fermentation of Xylose for Xylitol Production in Stirred Tank Bioreactor.  
*Process Biochem.*, 31, 6, 549-553.
- Singh, K. H., Cote, L. G., and Hadfield, M. T. (1994)  
Manipulation of Enzyme Regioselectivity by Solvent Engineering: Enzymatic  
Synthesis of 5'-o-Acylribonucleosides.  
*Tetrahedron Lett.*, 35, 9, 1353-1356.
- Therisod, M. and Klibanov, A. M. (1986)  
Facile Enzymatic Preparation of Monoacylated Sugars in Pyridine.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 108, 18, 5638-5640.
- Thevenin, M. A., Grossiord, J. L., and Poelman, M. C. (1996)  
Sucrose Esters/Cosurfactant Microemulsion System for Transdermal Delivery:  
Assessment of Bicontinuous Structures.  
*Int. J. Pharm.*, 137, 177-186.
- Torres, C., Bernabé, M., and Otero, C. (2000)  
Enzymatic Synthesis of Lactic Derivatives With Emulsifying Properties.  
*Biotechnol. Lett.*, 22, 331-334.
- Torres, C. and Otero, C. (1999a)  
Part I. Enzymatic Synthesis of Lactate and Glycolate Esters of Fatty Alcohols.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 25, 745-752.
- Torres, C., Otero, C., and Bernabé, M. (1999b)  
Part II. Two Enzymatic Procedures for the Selective Synthesis of Malic Acid  
Monoesters.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 25, 753-761.
- Tsitsimpikou, H., Daflos, H., and Kolisis, F. N. (1997)  
Comparative Studies on the Sugar Esters Synthesis Catalyzed by *Candida antarctica*  
and *Candida rugosa* Lipases in Hexane.  
*J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, 3, 189-192.
- Tweddell, R. J., Kermasha, S., Combes, D., and Marty, A. (1998)  
Esterification and Interesterification Activities of Lipases From *Rhizopus niveus* and  
*Mucor miehei* in Three Different Types of Organic Media: a Comparative Study.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 22, 439-445.
- Ullmanns (1995)  
Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry.  
Wiley Interscience, 5th. Completely Revised Edition, New York U.S.A.

- Vija, H., Telling, A., and Tougu, V. (1997)  
Lipase-Catalyzed Esterification in Supercritical Carbon Dioxide and in Hexane.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7, 3, 259-262.
- Villeneuve, P., Foglia, T. A., Mangos, T. J., and Nuñez, A. (1998)  
Synthesis of Polyfunctional Glycerol Esters: Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol With Diesters.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 11, 1545-1549.
- Vulfson, E. N. (1993)  
Enzymatic Synthesis of Food Ingredients in Low-Water Media .  
*Trends Food Sci. Technol.*, 4, 209-215.
- Ward, O., Fang, J., and Li, Z. (1997)  
Lipase-Catalyzed Synthesis of a Sugar Containing Arachidonic Acid.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 20, 52-56.
- Wehtje, E. and Adlercreutz, P. (1997)  
Water Activity and Substrate Concentration Effects on Lipase Activity.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 55, 5, 798-806.
- Wescott, C. and Klibanov, A. M. (1994)  
The Solvent Dependence of Enzyme Specificity.  
*Biochim Biophys Acta*, 1206, 1-9.
- Wong, D. (1995)  
Lypolitic Enzymes  
in Food Enzymes, Chapman & Hall, London, First Edition, 170-200.
- Woudenberg-van Oosterom, M., Van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A. (1996)  
Regioselective Acylation of Disaccharides in Tert-Butyl Alcohol Catalyzed by *Candida antartica* Lipase.  
*Biotechnol. Bioeng.*, 49, 3, 328-333.
- Xia, Y. and Johnson, A. W. (1997a)  
Effects of Leaf Surface Moisture and Relative Humidity on the Efficacy of Sugar Esters Form *Nicotiana glauca* Against the Tobacco Aphid (Homoptera: Aphididae).  
*J. Econ. Entomol.*, 90, 4, 1010-1014.
- Xia, Y., Johnson, A. W., and Chortyk, O. T. (1997b)  
Enhanced Toxicity of Sugar Esters to the Tobacco Aphid (Homoptera: Aphididae) Using Humectants.  
*J. Econ. Entomol.*, 90, 4, 1015-1021.

Yahya, A., Anderson, W., and Moo-Young, M. (1998)  
Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 23, 438-450.

Zarif, L., Greiner, J., Pace, S., and Riess, J. (1990)  
Synthesis of Perfluoralkylated Xylitol Ethers and Esters: New Surfactants for  
Biomedical Uses.  
*J. Med. Chem.*, 33, 4, 1262-1269.