



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LIBRO DE EXAMENES
ADSTOLIBRERIA

"MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS DE ORIGEN ANIMAL EN DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO"

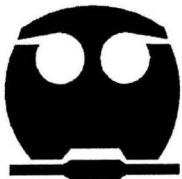
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

BRENDA SANCHEZ SALAZAR



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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	Prof. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA
Vocal	Prof. HERMILO LEAL LARA
Secretario	Prof. AMELIA MA. GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA
1er. Suplente	Prof. ISMAEL BUSTOS JAIMES
2do. Suplente	Prof. FRANCISCO RUÍZ TERÁN

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 314, Edificio "E", Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

Asesor: EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

Sustentante: BRENDA SÁNCHEZ SALAZAR



Handwritten signature of E. Barzana over a horizontal line.

**A mi MAMÁ por ser la mejor madre del mundo y colmarme de amor,
comprensión y apoyo en todo momento.**

**A Liliana y Maribel porque además de ser mis hermanas,
son mis mejores amigas.**

A mi PAPÁ por las enseñanzas y los buenos momentos.

**A Alejandro por estar siempre a mi lado y compartir
todo este proceso conmigo.**

**A la National Renderers Association, Inc. proyecto 300
por el apoyo económico brindado para la realización del presente.**

**Al Dr. Eduardo Bárzana García por ser un profesor ejemplar, por su
amistad, respeto y enseñanza en todo este proceso.**

**A mis amigas Janeth, Mariana, Maricela, Miriam
por los grandes momentos que compartimos durante la carrera.**

**A mis amigos de laboratorio Polita, Lázaro, Rodolfo
por sus consejos y su amistad brindada.**

**A los miembros del jurado Dra. Amelia Farrés González Saravia
y el Dr. Hermilo Leal Lara por sus sugerencias
para el mejoramiento del presente.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México
por la oportunidad de estudiar en sus instalaciones.**

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	3
RESUMEN	5
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Planteamiento del problema	6
1.2. Objetivos	7
1.2.1. General	7
1.2.2. Particulares	7
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	8
2.1. Lípidos y su composición	8
2.2. Lípidos estructurados	12
2.3. Proceso de interesterificación	13
2.4. Lipasas	15
2.5. Fluidos supercríticos	19
2.6. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO ₂ SC	20
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	22
3.1. Materiales	22
3.2. Metodos	22
3.2.1. Interesterificación enzimática en hexano	22
3.2.2. Interesterificación enzimática en CO ₂ SC	23

	Página
3.2.3. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO ₂ SC	23
3.2.4. Derivatización	24
3.2.5. Análisis de composición de ácidos grasos	24
3.2.6. Determinación del intervalo de fusión	25
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
4.1. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO ₂ SC	26
4.2. Análisis de ácidos grasos	27
4.3. Interesterificación enzimática de grasa de origen animal	29
4.4. Efectos asociados al contenido de agua (y la actividad acuosa)	33
4.5. Modificaciones en la estructura del sebo	35
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO 6. REFERENCIAS	39

RESUMEN

Los lípidos estructurados son triacilglicerolos que han sido modificados para producir nuevos triglicéridos que presentan características físicas mejoradas y nutricionales. Las características físicas de las grasas se ven afectadas, en gran medida, por la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes (por ejemplo, longitud de cadena y grado de insaturación). La interesterificación es uno de los procesos que ha sido utilizado en los últimos años para mejorar la utilidad de ciertas grasas.

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de triglicéridos modificados estructuralmente a partir de grasa de origen animal, mediante su interesterificación con ácido linoleico vía enzimática utilizando una lipasa comercial. Dicha reacción se efectuó en dos medios, uno con hexano y el otro con dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC), para comparar sus rendimientos de reacción.

Después de la reacción de interesterificación se llevó a cabo la metilación tanto de los ácidos grasos libres como de los esterificados en la mezcla de reacción, para cuantificar la composición final por cromatografía de gases. El curso de la reacción se monitoreó siguiendo la incorporación de ácido linoleico a los triglicéridos presentes en la grasa animal. Se encontró que la interesterificación llevada a cabo en hexano sólo obtuvo un rendimiento del 10.68%, mientras que en CO₂SC la reacción alcanzó una esterificación de ácido linoleico del 27.46%.

En relación a las pruebas comparativas de propiedades de las grasas, tanto del sustrato original como el modificado enzimáticamente en CO₂SC, se realizaron dos análisis a las muestras. Primero se analizó la diferencia existente en el perfil de ácidos grasos presentes en ambas grasas, seguido de una determinación del rango de fusión de éstas (método Oficial de la AOAC 920.157). Se encontró que la grasa modificada presentaba un perfil cromatográfico de ácidos grasos diferente a la muestra original, lo que se vio reflejado en su temperatura de fusión, pues ésta disminuyó debido a la incorporación de ácido linoleico al esqueleto inicial de los triacilglicerolos del sustrato.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El papel de las grasas y aceites en la nutrición humana es actualmente un tema de gran importancia. No podemos olvidar que los lípidos son parte esencial de nuestra dieta y que las vitaminas liposolubles, algunas hormonas y los ácidos grasos esenciales se encuentran en las grasas que comemos. Contradictoriamente, hay una clara tendencia social enfocada a eliminar las grasas de los alimentos. La cantidad y el tipo de grasa que consumimos es lo que realmente importa, pues las propiedades físicas, reológicas y nutricionales de los triglicéridos están basadas no solo en la composición de los ácidos grasos, sino también en la distribución de su posición en los triglicéridos, grado de insaturación y configuración isomérica. Es por eso que debemos ir más allá de juzgar a la grasa como un ingrediente dañino. Los beneficios que se comienzan a ver por su consumo permiten considerarla como un "nutracéutico" con potencial para la prevención y tratamiento de enfermedades. Por tanto, la síntesis de lípidos estructurados es de gran importancia ya que una nueva estructura en los triglicéridos puede optimizar su absorción y nutrición en el cuerpo humano.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

- Estudiar la reacción de interesterificación en dióxido de carbono supercrítico de triacilglicéridos de origen animal y ácido linoleico con lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada Novozyme 435, esperando obtener lípidos con un alto contenido de ácido linoleico residual y características del tipo “nutracéutico”.

1.2.2. Particulares

- Evaluar el ácido linoleico incorporado a triglicéridos de grasa animal vía interesterificación enzimática en solvente orgánico (hexano).
- Evaluar el ácido linoleico incorporado a triglicéridos de grasa animal vía interesterificación enzimática en CO₂ supercrítico.
- Determinar el medio en las que la lipasa presenta el mejor rendimiento del nutracéutico.
- Estudiar el efecto de la actividad acuosa (a_w) en la reacción de interesterificación en CO₂ supercrítico.
- Analizar la estructura de los triglicéridos derivados de la modificación enzimática en CO₂ supercrítico con base en el perfil de ácidos e intervalo de fusión.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Lípidos y su composición

Los lípidos, junto con las proteínas y los carbohidratos, son macronutrientes necesarios en la nutrición humana. Las funciones biológicas de los lípidos son muy diversas, ya que son las moléculas principales de almacenamiento energético y son fundamentales en la formación de estructuras celulares como las membranas. Asimismo, proveen de ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los eicosanoides y de otros derivados bioactivos que juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, hormonas y mensajeros intracelulares (*Akoh & Min, 2002*). También constituyen el vehículo de vitaminas liposolubles y organolépticamente aportan la palatabilidad y el sabor de las comidas, además de ser los componentes más importantes en la saciedad post-prandial que producen los alimentos.

Aunque los lípidos que se encuentran como componentes de la dieta son complejos y de una gran variedad estructural, desde el punto de vista cuantitativo los triglicéridos son los constituyentes mayoritarios (93-95% del total de los lípidos ingeridos), por lo cual los esfuerzos tecnológicos orientados al desarrollo de nuevos tipos de lípidos están enfocados principalmente a la elaboración de nuevos triglicéridos (*Marangoni & Rousseau, 1995*).

Las grasas (sólidas) o aceites (líquidos) más comunes son una mezcla de triacilglicéridos con cantidades menores de otros lípidos. Un triglicérido es el producto de la esterificación del polialcohol glicerol con tres ácidos grasos, los que pueden ser iguales o diferentes en sus características moleculares —tamaño de cadena, grado de insaturación, isomería, entre otras (*Bailey, 1982*).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas laterales hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos. En algunos ácidos grasos esta cadena está completamente saturada (no tiene dobles enlaces) y sin ramificar, mientras que otros contienen uno o varios dobles enlaces. La nomenclatura simplificada de estos

compuestos especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces separados por dos puntos; mientras que las posiciones de los dobles enlaces se distinguen por exponentes que siguen a una Δ (delta), como se muestra en la Tabla 1. Por ejemplo, el ácido oleico, que tiene 18 átomos de carbono y tiene una insaturación entre C-9 y C10, se designa 18:1 (Δ^9).

Tabla 1. Nomenclatura de los ácidos grasos más comunes.

Esqueleto Carbonado	Nombre sistemático	Nombre común	Símbolo	Punto de fusión (°C)
4:0	Butanoico	Butírico	B	-7,9
6:0	Hexanoico	Caproico	H	-3,4
8:0	Ocatanoico	Caprílico	Oc	16,7
10:0	Decanoico	Cáprico	D	31,4
12:0	Dodecanoico	Láurico	La	44,2
14:0	Tetradecanoico	Mirístico	M	53,9
16:0	Hexadecanoico	Palmítico	P	63,1
16:1(Δ^9)	9-Hexadecanoico	Palmitoleico	Po	-0,5
18:0	Octadecanoico	Estearico	St	69,6
18:1(Δ^9)	9-Octadecenoico	Oleico	O	13,4
18:2($\Delta^{9,12}$)	9,12-Octadecadienoico	Linoleico	L	-5,0
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	9,12,15-Octadecatrienoico	Linolénico	Ln	-11,0
20:0	Araquídico	Eicosanoico	Ad	76,5
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	5,8,11,14-Eicosatetranoico	Araquidónico	An	-49,5

Fuente: *Nelson & Cox, 2001.*

Los ácidos grasos raramente se encuentran libres en la naturaleza; más bien se hallan en forma esterificada como componentes mayoritarios de los diversos lípidos y son la parte con mayor interés desde el punto de vista industrial y alimentario.

Las propiedades de los ácidos grasos, y de los compuestos que los contienen, vienen determinadas en gran parte por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada, lo que dictamina parcialmente sus propiedades físicas y funcionales.

La naturaleza química de los lípidos depende de la estructura y distribución de los ácidos grasos contenidos en su esqueleto de glicerol (Figura 1). En las plantas superiores y en los animales, los ácidos grasos predominantes son los de las especies de C₁₆ y C₁₈, o sea, los ácidos palmítico, oleico, linoleico y esteárico.

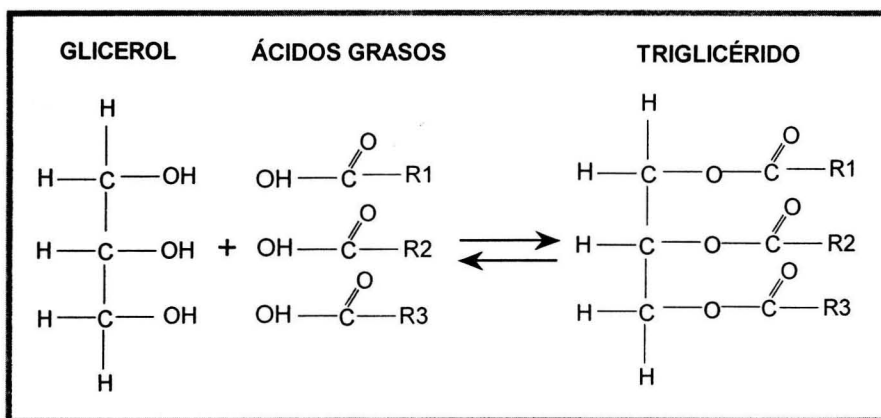


Figura 1. Estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R1, R2, y R3) consisten de una cadena de carbonos de longitud y saturación variable.

Los triacilglicéridos compuestos de ácidos grasos saturados (como mirístico, palmítico o esteárico) tiene punto de fusión altos y son generalmente sólidos a temperatura ambiente, mientras que los triacilgliceroles que contienen ácidos grasos mono- o poliinsaturados (como oleico, linoleico o linoléico), son usualmente líquidos a temperatura ambiente (Tabla 1). La mantequilla, por ejemplo, contiene ~70% de ácidos grasos saturados, mientras que muchos aceites vegetales contienen casi exclusivamente ácidos grasos insaturados. Las grasas del reino animal (sebo, lardo, manteca, etc.) contienen cantidades elevadas de ácidos

grasos C16 y C18 y en la posición *sn*-2 (Figura 2) poseen ácidos grasos insaturados, principalmente oleico y linoleico (Bailey, 1982).

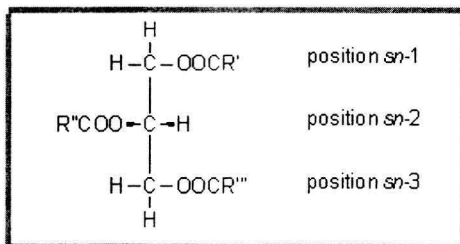


Figura 2. Sistema de numeración estereoespecífica de los triglicéridos.

Los dobles enlaces de los ácidos grasos tienen casi siempre la configuración *cis*, como es el caso del ácido linoleico que se muestra en la Figura 3. Estos introducen una rígida curvatura de 30° en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados que interfiere con su eficiente empaquetamiento. La consecuente reducción de las interacciones de van der Waals hace que los puntos de fusión de los ácidos grasos disminuyan con su grado de insaturación. De igual modo la fluidez de los lípidos aumenta con el grado de insaturación de los restos de ácidos grasos que los constituyen.

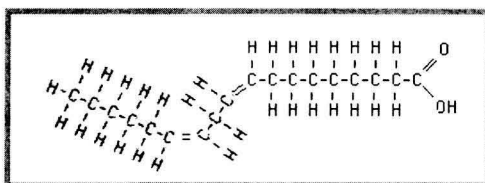


Figura 3. Ácido linoleico, ácido graso insaturado C₁₈.

Los ácidos grasos saturados son moléculas muy flexibles que pueden adoptar un gran número de conformaciones debido a que existe una rotación libre alrededor de sus enlaces C-C. Los puntos de fusión de los ácidos grasos saturados, de igual manera que con la mayoría de las sustancias, aumentan con la masa molecular.

2.2. Lípidos estructurados

Los lípidos estructurados son triacilgliceroles que han sido modificados por la incorporación de nuevos ácidos grasos, modificados para cambiar la posición de sus ácidos grasos o su perfil de ácidos grasos de su estado natural, o sintetizados para producir nuevos triacilgliceroles (*Akho & Min, 2002*).

Este tipo de lípidos está referido frecuentemente como una nueva generación de grasas que pueden ser considerados como "nutracéuticos": alimentos o partes de ellos que proveen beneficios médicos o de salud. Estos incluyen el potencial para la prevención y/o tratamiento de enfermedades, ya que pueden brindar alguna función específica o un bajo grado de metabolización (*Kennedy, 1991; Gandhi, et al., 2000*).

Los lípidos estructurados pueden ser manipulados para mejorar sus características físicas como sus puntos de fusión. Por ejemplo, en la fabricación de margarinas y mantecas se puede llevar a cabo la transesterificación de aceites y/o grasas para mejorar el intervalo de fusión y la plasticidad del producto, siendo posible además el modificar positivamente sus efectos a nivel de lípidos sanguíneos (*Meijer & Weststrate, 1997*).

Otro lípido estructurado de gran importancia, identificado como Betapol Ò producido por Loders & Crokiaan, de Dinamarca, es un triglicérido obtenido mediante un procedimiento enzimático cuya estructura principal es OPO (*sn*-glicerol-1-oleato-2-palmitato-3-oleato), esto es, que tiene la misma estructura del triglicérido mayoritario de la leche materna humana. Mediante la adición de este triglicérido a fórmulas de reemplazo a la leche materna es posible igualar con mucho mayor aproximación la composición y la estereoquímica de los lípidos de la leche humana, con los beneficios nutricionales y de salud que esto conlleva. Uno de los efectos más relevantes es que un producto formulado con Betapol o con otro lípido de estructura similar, puede disminuir sustancialmente la formación de jabones de ácidos grasos saturados en el lumen intestinal, favoreciendo la formación de evacuaciones más blandas y permitir una mejor biodisponibilidad de

los ácidos grasos liberados por la hidrólisis, por lo cual puede evitar o disminuir las situaciones de estreñimiento en los lactantes (*Lucas, et al. 1997*).

Los lípidos estructurados también están siendo utilizados en la formulación de productos para nutrición enteral o parenteral, ya que de alguna manera es posible establecer el destino metabólico de los ácidos grasos, dependiendo del tamaño de la cadena y de la posición que ocupe un determinado ácido graso en la estructura del triglicérido. De esta forma no sólo se logra obtener beneficios nutricionales en pacientes con requerimientos específicos, sino que también es posible prevenir el riesgo de morbilidad y de mortalidad por algunas patologías de gran prevalencia, como es el caso de las enfermedades cardio-vasculares, a través del consumo de aceites diseñados con una estereoquímica específica (*Hunter, 2001*).

2.3. Proceso de interesterificación

La interesterificación química ha sido factible industrialmente en la elaboración de alimentos desde los años 1940s, para mejorar las propiedades de textura, de extensión, de modificación del punto de fusión y de mejora de la estabilidad. Hoy en día, juega un papel clave en la producción de sustitutos de grasas con bajo contenido calórico, tales como Olestra® de Procter & Gamble y Salatrim® de la empresa Nabisco (*Min Kuo & Gardner, 2002*).

La mayoría de las tecnologías de modificación de grasas y aceites han tenido éxito comercial mediante el mezclado de triglicéridos, hidrogenación o fraccionamiento. Sin embargo, con excepción del mezclado, estos procesos son un poco agresivos para aceites y grasas comestibles debido al uso de catalizadores químicos a altas temperaturas, principalmente el metóxido de sodio, o a los solventes utilizados en altas concentraciones que por consiguiente requieren de una manipulación exhaustiva después del proceso. Además, este procedimiento es

azaroso (por su propia naturaleza química), dando como resultado estructuras de moléculas completamente aleatorias (Ghazali, et al., 1995).

Los lípidos producidos industrialmente mediante modificación química desafortunadamente originan ácidos grasos *trans* (Figura 4), que pueden tener efectos más indeseables que las grasas saturadas ya que incrementan el colesterol malo conocido como LDL (Low-Density Lipoproteins) y disminuyen el colesterol bueno HDL (High-Density Lipoproteins) (Constant, 2004). Una ingesta diaria de ácidos grasos *trans* conduce a su incorporación dentro de las células involucradas en la regulación del ritmo cardiaco, con un decremento subsecuente en el umbral de arritmias cardiacas que son una de las mayores causas de muerte cardiaca repentina (Stender & Dyerberg, 2004).

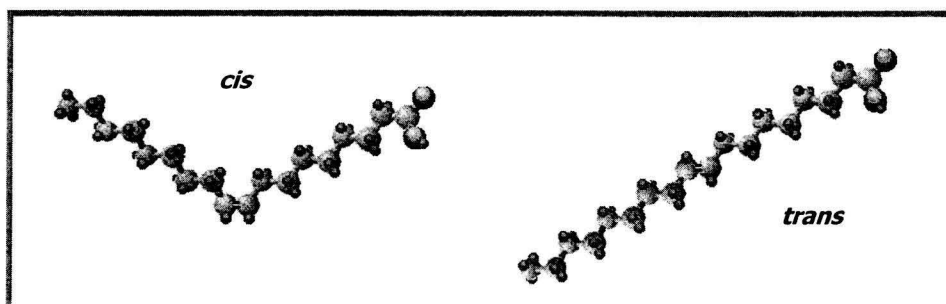


Figura 4. Proyecciones moleculares tridimensionales que muestra los isómeros del ácido-9-octadecanoico en sus configuraciones *cis* y *trans*.

Estas desventajas han originado un interés especial por las reacciones catalizadas por lipasas, ya que estas enzimas poseen buena actividad y selectividad hacia sus sustratos naturales y generan preferentemente estructuras del tipo *cis*.

La interesterificación enzimática es más específica, requiere de condiciones de reacción menos severas, implica menor costo y es posible llevar a cabo un mayor control de la composición del producto final. Además, las enzimas

inmovilizadas pueden ser empleadas en este tipo de reacciones y son reutilizables, lo que las hace económicamente atractivas.

Esta reacción simple produce grasas más naturales que los métodos químicos, puesto que preserva la posición *sn-2* de las moléculas de triglicéridos y cambia solamente las posiciones *sn-1* y *sn-3* de la molécula del triglicérido.

El proceso industrial para este tipo de reacciones es simple de instalar y fácil de operar. Esto se traduce en menores costos de inversión debido a los ahorros de equipo y menor costo operacional (*www.novozymes.com*).

2.4. Lipasas

La interesterificación enzimática se lleva a cabo mediante el empleo de lipasas, enzimas obtenidas predominantemente de bacterias, levaduras y hongos. Las lipasas extracelulares son producidas por microorganismos y liberadas en su ambiente de desarrollo para digerir materiales lipídicos (*Macrae, 1983*).

Las lipasas (acil-éster-hidrolasas de triacilgliceroles, EC 3.1.1.3) constituyen un grupo diverso de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar triglicéridos en una interfase lípido-agua. Su actividad se incrementa dramáticamente después de enlazarse a la superficie del lípido debido al cambio conformacional de la enzima (*Uppenberg, et al. 1994a*).

Las lipasas tienen gran afinidad por superficies hidrofóbicas y pueden ser completamente adsorbidas en un medio acuoso por la emulsificación de triacilgliceroles de cadena larga. Particularmente importante es que pueden llevar a cabo la reacción reversible de síntesis de ésteres bajo condiciones limitadas de agua (*Balcão & Malcata, 1997*). Los sistemas enzimáticos de interesterificación están compuestos de una fase continua hidrofóbica (conteniendo el sustrato lipídico) y una fase acuosa (conteniendo la lipasa).

La interesterificación catalizada por enzimas es una reacción multisustratos, donde los sustratos principales (glicéridos, ácidos grasos y agua) siguen una cinética de reacción del tipo Bi-Bi Ping-Pong. La reacción puede ser considerada

como un caso de transferencia del grupo ácido, que involucra reacciones de hidrólisis y esterificación secuenciales (Figura 5).

La levadura *Candida antarctica* produce una lipasa de actividad no específica hacia los triglicéridos que actúa incluso a altas temperaturas. Se han aislado dos lipasas llamadas A y B. La lipasa A es inespecífica y la más termoestable, con un peso molecular de 45 kDa y un punto isoelectrico (P_I) de 7.5. Mientras que la lipasa B (CALB) tiene un peso molecular de 33 kDa y un P_I de 6.0 (Uppenberg *et al.*, 1994b).

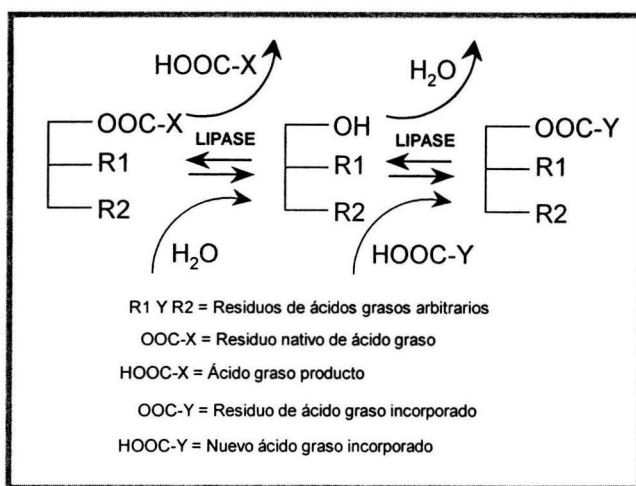


Figura 5. Reacción general de la interesterificación catalizada por lipasa

Fuente: *Reyes & Hill, 1994.*

La lipasa B de *Candida antarctica* ha demostrado ser una enzima muy estereoespecífica en hidrólisis y en síntesis orgánica, además de ser una lipasa interesante con un potencial de aplicación en un gran número de procesos industriales, tales como la síntesis de triglicéridos, esterificación de alcoholes terpénicos, preparación de enantiómeros, síntesis de glucolípidos y muchos otros procesos más (Gandhi, 1997).

Se ha determinado la secuencia de ADN y de aminoácidos de la CALB y su estructura cristalina tridimensional. La estructura de esta lipasa demuestra que la

enzima tiene una tríada catalítica de Ser-His-Asp en su sitio activo. La estructura parece estar en conformación abierta con una entrada algo restringida al sitio activo, lo que establece la especificidad del sustrato y el alto grado de estereoespecificidad de esta lipasa (*Uppenberg, et al., 1994b*).

El mecanismo de acilación-desacilación del glicérido en el sitio activo se muestra en la Figura 6. Durante la acilación se forma un complejo covalente enzima-acilo por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo sobre el carbono carbonilo del sustrato. La serina se convierte en un nucleófilo fuerte por la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico. El anillo imidazol de la histidina se protona y carga positivamente, estabilizado por la carga negativa de los ácidos aspártico y glutámico del sitio activo. En seguida se forma un intermediario tetrahédrico, estabilizado por los dos enlaces de hidrógeno formados con residuos oxianiónicos estabilizantes. Un rompimiento en el enlace carbono-oxígeno causa el desplazamiento del alcohol. Durante la reacción, el acilglicerol es asociado con la tríada catalítica a través de enlaces covalentes. El hidrógeno de la histidina enlaza a la serina y al oxígeno del grupo alcohol saliente. El ataque nucleofílico del agua o el alcohol causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono del carbonilo, produciendo un intermediario tetrahédrico, el cual sufre un rearreglo, desprendiendo el acilglicerol alterado y regenerando el sitio activo de serina (*Reyes & Hill, 1994; Marangoni & Rousseau, 1995; Bousquet-Dubouch, et al., 2001*).

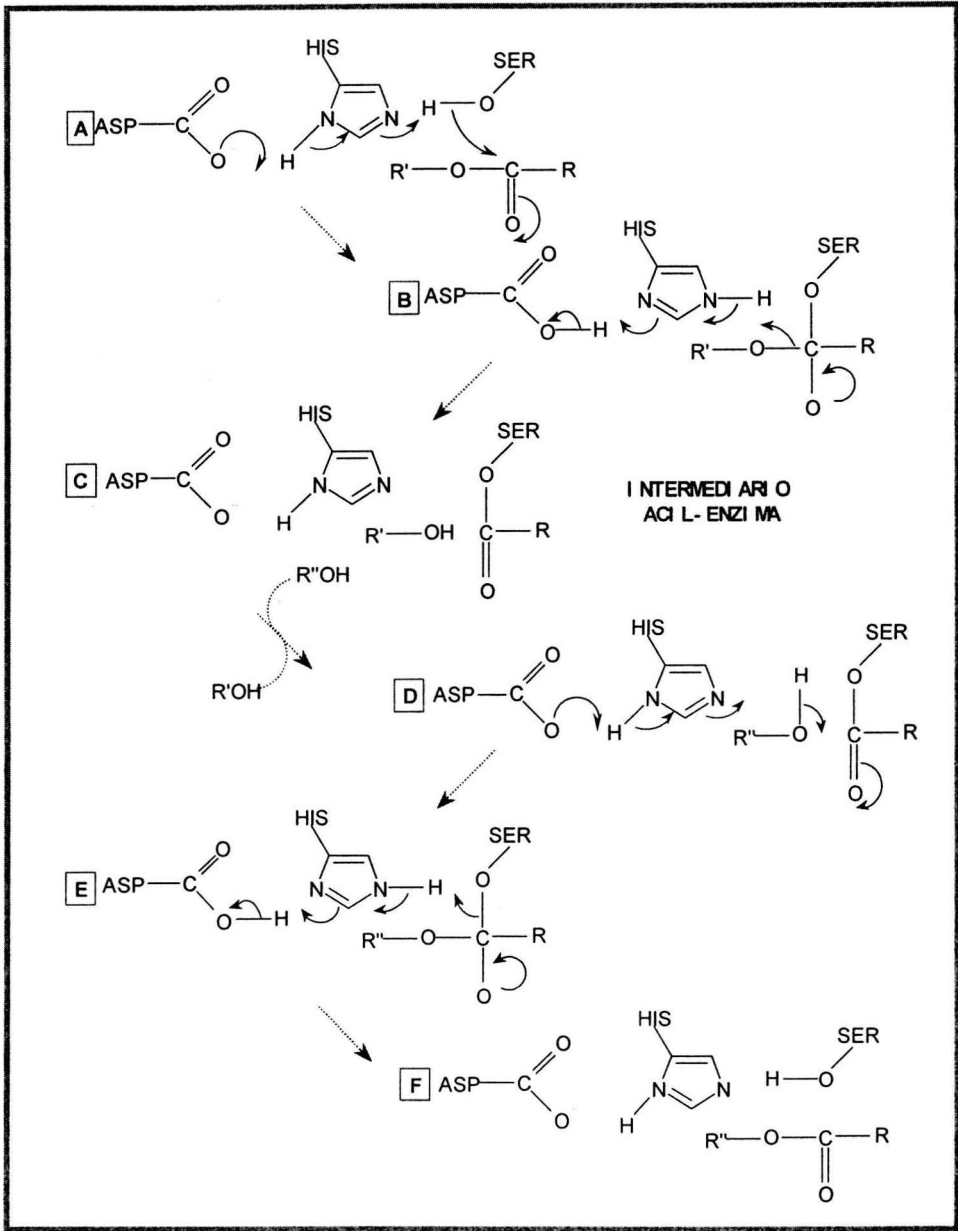


Figura 6. Mecanismo de la reacción de interesterificación catalizada por lipasa
(Adaptado de la referencia Marangoni & Rousseau, 1995).

2.5. Fluidos supercríticos

El estado supercrítico se alcanza cuando la temperatura y la presión de una sustancia condensable se eleva sobre valores críticos (constantes para cada compuesto). En el estado supercrítico la distinción entre el líquido y la fase gas ha desaparecido. Mas allá del punto crítico (T_c , P_c) no existe frontera (o línea de equilibrio) entre el estado líquido y el gaseoso, frontera que sí existe entre el líquido y el gas abajo del punto crítico según se observa en el diagrama de fases (Figura 7).

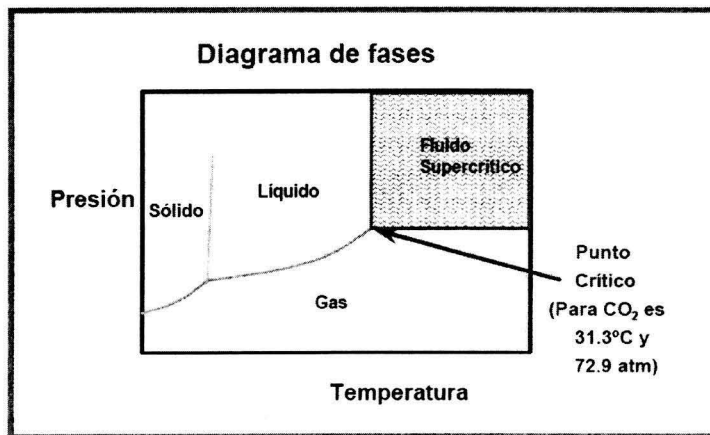


Figura 7. Diagrama de fases para una sustancia pura.

Así, las características fisicoquímicas del líquido dado, tales como densidad, difusividad, constante dieléctrica y viscosidad pueden ser controladas fácilmente cambiando la presión o la temperatura sin cruzar los límites de la fase (*Sihvonen, et al. 1999*).

Los fluidos supercríticos se conocen desde principios de 1800, pero no fue sino hasta los años cincuenta que se empezaron a considerar como una alternativa de uso industrial. Todos los fluidos supercríticos tienen propiedades intermedias entre los gases y los líquidos, como se aprecia en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de propiedades físicas del fluido supercrítico, gas y líquido.

Estado	Densidad (g mL⁻¹)	Viscosidad (g cm⁻¹ sec⁻¹)	Coefficiente de difusión (cm² sec⁻¹)
Gaseoso (ambiente)	0.0006-0.002	0.0001-0.003	0.1-0.4
Fluido supercrítico (Tc Pc)	0.2-0.5	0.0001-0.0003	0.0007
Líquido (ambiente)	0.6-1.6	0.002-0.03	0.000002-0.00002

Fuente: *Taylor, 1996.*

Así, los fluidos supercríticos tienen un gran número de ventajas con respecto a los solventes orgánicos convencionales, incluyendo altas difusividades y bajas viscosidades, las cuales incrementan la transferencia de masa del sustrato al catalizador, alto poder disolvente de sustancias hidrofóbicas, se pueden llevar a cabo procesos a baja temperatura permitiendo el manejo de sustancias termolábiles y una fácil recuperación de producto sin residuos de solvente (*Randolph et al. 1985*), además de ser la base de procesos respetuosos del medio ambiente. Estas características son especialmente importantes tanto en la industria farmacéutica como en la de alimentos.

Desde las primeras demostraciones en 1985 de Raldolph, *et al.*, Hammond, *et al.*, y Nakamura, *et al.*, quienes encontraron que las enzimas son activas y estables en fluidos supercríticos, se han reportado muchos estudios sobre la catálisis enzimática de reacciones en fluidos supercríticos.

Por su parte el CO₂ es el líquido supercrítico más extensamente utilizado, debido a que es un buen solvente, tiene baja toxicidad, es no flamable, de bajo costo, fácil de remover de los productos y su temperatura crítica es relativamente baja Tc=31.1°C (*Mesiano, et al., 1999*).

2.6. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO₂SC

La tecnología de fluidos supercríticos en el procesamiento de grasas y aceites ha sido ampliamente estudiada durante las últimas tres décadas. Se han

reportado fluidos supercríticos, tales como el etano y el propano, como los mejores solventes para lípidos, pero la mayoría de los estudios se han llevado a cabo haciendo uso del dióxido de carbono supercrítico debido a sus características tan prácticas.

Las grasas y aceites son mezclas complejas de componentes que pertenecen a diferentes clases de lípidos, incluyendo los ácidos grasos esterificados mono-, di-, y triglicéridos. En dichas mezclas, las interacciones intermoleculares complejas nos llevan a desviaciones significativas con respecto a las solubilidades de los componentes puros. Se han estudiado varios sistemas binarios de lípidos puros en CO_2SC , pero los datos sobre sistemas multicomponentes son escasos (*Güçlü-Üstündağ & Temelli, 2000*).

Las solubilidades de los ácidos grasos en CO_2SC son dependientes de sus presiones de vapor las cuales están relacionadas directamente con el largo de la cadena y su insaturación. La presión de vapor de los monoglicéridos es mayor que las de los triglicéridos, los cuales presentan una presión de vapor extremadamente baja (*Shishikura, et al., 1994*).

Nilsson & Hudson (1993) trabajaron con triglicéridos simples (aquéllos que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones del glicerol) y mezclas de éstos para determinar su solubilidad en CO_2SC y encontraron que las solubilidades entre 170-300 bar muestran una dependencia débil de la presión y que la solubilidad decrece con el incremento del número de carbonos en la cadena o el peso molecular; esto se debe a la presencia de insaturaciones en la estructura, las cuales reducen considerablemente el punto de fusión.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

El sebo vacuno utilizado en este estudio fue proporcionado por la National Renderers Association (USA). La lipasa B comercial de *Candida antarctica*, aislada e inmovilizada en una resina de acrilatos (NOVOZYME 435 10,000 PLU/g) fue amablemente facilitada por Novo de México. Ácido linoleico al 99% y metil linoleato al 99% para cromatografía de gases (Sigma-Aldrich). Hexanos, alcohol etílico y alcohol metílico grado analítico (J.T. Baker). Ácido clorhídrico grado analítico, cloruro de Potasio grado analítico, hidróxido de potasio grado analítico (Merck). Solución sobresaturada de $MgCl_2$ ($a_w=0.356$). Solución sobresaturada de K_2SO_4 ($a_w=0.976$). Dióxido de carbono grado industrial (Praxair). Mezcla estándar cuantitativa de ésteres metílicos AOCS #6 (Restek).

3.3. Métodos

NOTA: Todas las reacciones de interesterificación y técnicas de análisis se realizaron por duplicado

3.2.1. Interesterificación enzimática en hexano

La reacción de interesterificación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca que contenían 293.3 mg de sebo, 571.6 mg (4.63mM) del ácido orgánico a esterificar (ácido linoleico), 86.74 mg de lipasa y 10 mL de hexano. La mezcla de reacción se calentó el tiempo específico de reacción en una incubadora con agitación orbital a 55° C y 200 rpm (*Sellappan & Akoh, 2001*). Al finalizar ésta la lipasa fue lavada tres veces con 5 mL hexano. El solvente recuperado del lavado fue incorporado al medio de reacción y se llevó al volumen original con nitrógeno.

3.2.2. Interesterificación enzimática en CO₂SC

La reacción de interesterificación se condujo en un reactor Parr de alta presión de 500 mL de capacidad, donde los sustratos (0.5 g de sebo, 1.3 g de ácido oleico) y 1 g del biocatalizador, fueron introducidos previamente. El reactor fue alimentado con dióxido de carbono por encima de los 4500 psi de presión por una bomba de pistón, calentado a la temperatura de reacción (55° C) y agitando a 200 rpm. La temperatura del sistema se mantuvo constante mediante un módulo controlador de temperatura. La reacción se consideró iniciada, cuando la temperatura y la presión del sistema fueron alcanzadas. Después del tiempo definido de reacción, ésta se detuvo con baño de hielo y el sistema se despresurizó. Los triglicéridos fueron recuperados mediante un lavado del reactor con hexano. La enzima siguió el mismo procedimiento de lavado. Ambos solventes recuperados por separado se combinaron y se concentraron a 10 mL bajo atmósfera de nitrógeno.

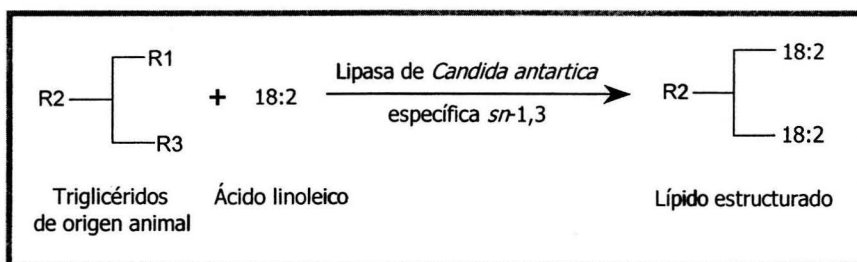


Figura 8. Preparación de lípidos estructurados por interesterificación enzimática.

3.2.3. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO₂SC

La solubilidad de los triglicéridos en el fluido supercrítico se determinó para cada una de las reacciones de interesterificación realizadas. La muestra de sebo se colocó en una bolsa porosa de papel dentro del sistema cuantificando el peso de cada una de éstas antes y después de realizada la reacción. Por diferencia de peso se determinó la cantidad de sebo solubilizado en CO₂SC dentro del sistema.

3.2.4. Derivatización

Después del tiempo de reacción predeterminado, se tomaron dos alícuotas de 0.5 ml de la mezcla de reacción y se concentraron bajo nitrógeno. En seguida se llevaron a cabo las siguientes reacciones de derivatización para preparar los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) presentes en cada alícuota:

a) Preparación con metóxido de sodio en metanol

En tubos de ensayo con tapón de rosa se disolvió el lípido seco en 1 mL de tolueno seco, se añadieron 2 mL de metóxido de sodio en metanol 0.5N y se calentaron los tubos 10 min a 50° C. Después de la incubación se añadieron 0.1 mL de ácido acético glacial, 5 mL de solución saturada de cloruro de sodio y 3 mL de hexano. Los tubos se agitaron 5 min en vortex y posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. La fase superior orgánica se transfirió a un tubo que contenía 1 g de sulfato de sodio anhidro. La mezcla de EMAG se colocó en un vial, donde se removió el hexano bajo atmósfera de nitrógeno. Los EMAG se reconstituyeron en 50 μ l de hexano y se analizaron por cromatografía de gases mediante la inyección de 1 μ l de muestra (*Li & Watkins, 2001*).

b) Preparación con ácido clorhídrico en metanol

Los triglicéridos de cada muestra se derivatizaron con ácido clorhídrico al 6% en metanol a 75° C por 2 horas para formar los correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos. Los EMAG se extrajeron con 2 ml de hexano y 1 ml de solución KCl 0.1M y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. La capa superior de hexano se separó en viales y se concentró bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 50 μ l de hexano y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo de gases (*Williams, et al. 1995; Li & Watkins, 2001*).

3.2.5. Análisis de la composición de ácidos grasos

Los EMAG se analizaron con un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, equipado con una columna de Carbowax 20 M (HP-20M) de 25mX0.32mm con 0.3 μ m de grueso de película, con detector de ionización de flama (FID) y operado

en un modo split. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 210 y 220° C, respectivamente. Al final de la corrida, el integrador proporcionó automáticamente los tiempos de retención y áreas de pico individuales.

La temperatura programada (rampa) para el cromatógrafo fue de 3 min a 50° C; la temperatura se elevó 10° C min⁻¹ hasta 195° C y después de un período isotérmico de 1 min la temperatura se aumentó 1° C min⁻¹ hasta 220° C (*Balcão & Malcata, 1998*).

Los valores de tiempos de retención de los ácidos grasos pertenecientes a las muestras de triglicéridos, se obtuvieron de una mezcla cuantitativa de estándares de ésteres metílicos (AOCS #6, Restek), cuyos componentes son los apropiados para el análisis de grasas de origen animal y aceite de palma. El área de pico para cada ácido graso identificado fue utilizada para calcular el porcentaje de cada ácido graso en las muestras.

3.2.6. Determinación del intervalo de fusión

El punto de fusión fue determinado por el método del tubo capilar de acuerdo con el método oficial de la AOAC 920.157. Para esto, un tubo capilar se sumergió completamente en la muestra líquida hasta aproximadamente 10 mm de alto del tubo. El final del tubo donde se encontraba la muestra, fue sellado con flama suave. Después de 6 horas de refrigeración a 4° C, el tubo capilar se unió a la parte final de un termómetro y se suspendió aprox. 30 mm dentro de un vaso de 600ml que contenía la mitad de agua destilada fría, aprox. 8-10° más abajo del punto de fusión de la muestra. Se aplicó calor suavemente para que la temperatura del baño aumentara lentamente hasta que la grasa dentro del capilar estuviera completamente clara. Se registró el inicio y el final de la fusión de la grasa.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Solubilidad de triglicéridos de origen animal en CO₂SC

Los resultados de *Chao, et al.* (1994) indican que la solubilidad de los lípidos en CO₂SC depende fuertemente de las condiciones de presión y temperaturas correspondientes a las diferentes densidades del fluido supercrítico. Encontraron que a condiciones de 345 bar y 50°C los productos de extracción son mayores.

Tomando en cuenta lo anterior, podemos afirmar que a las condiciones de reacción empleadas en el presente trabajo (345-350 bar y 55° C) se logró solubilizar una parte importante de los ácidos grasos presentes en el sebo.

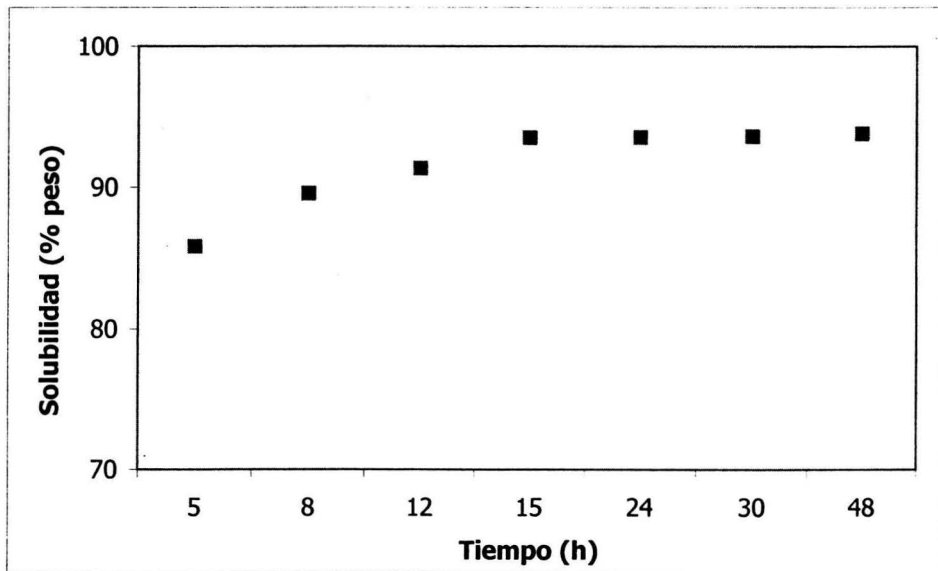


Figura 9. Solubilidad de 0.5 g de triglicéridos de origen animal en CO₂SC a 350 bar, 55° C y 200 rpm en función del tiempo.

Como se observa en la Figura 9 se obtuvo una solubilidad del 85%, a partir de las cinco horas de reacción, con una solubilidad máxima del 91% entre las 15 y 48 horas de reacción.

4.2. Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos juegan un papel importante en los tejidos biológicos y al ser componentes de alimentos sirven como fuente de energía. Éste tipo de ácidos grasos son comúnmente analizados mediante cromatografía de gases por medio de sus derivados los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). Estos derivados tienen menores puntos de ebullición, lo que los hace más volátiles y por lo tanto más apropiados para su análisis en cromatografía de gases (*Eder, 1995*).

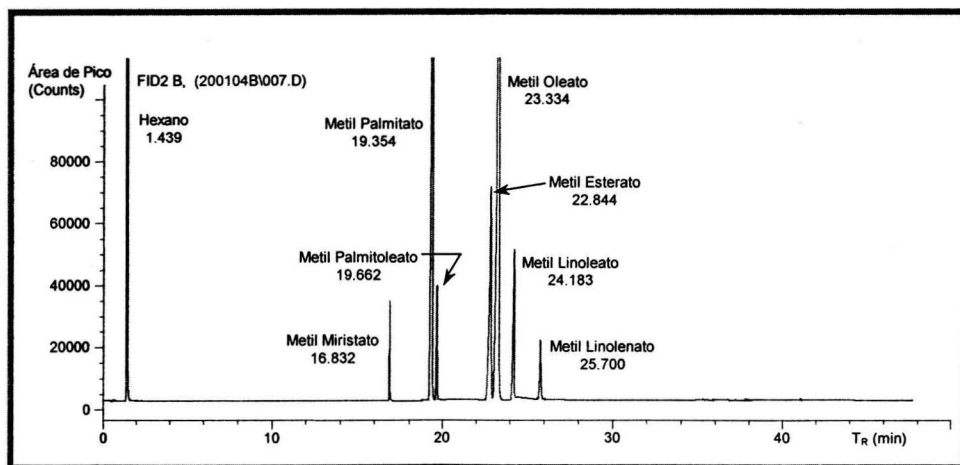


Figura 10. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos de la mezcla estándar obtenido por cromatografía de gases.

Una columna cromatográfica separa los EMAG de acuerdo a: 1) el largo de la cadena del ácido graso y 2) el número de insaturaciones. Se empleó una mezcla estándar cuantitativa de ésteres metílicos de ácidos grasos (AOCs #6, Restek), para determinar el orden de elución y tiempo de retención de los ácidos grasos

encontrados comúnmente en muestras de sebo vacuno (Figura 10) y compararlos directamente con los EMAG obtenidos en las muestras de este trabajo.

Los ácidos grasos de cada muestra, tanto los libres como los esterificados en triglicéridos fueron derivatizados. Se utilizaron dos técnicas de derivatización, una con metóxido de sodio en metanol y otra con ácido clorhídrico en metanol. La primera técnica se basa en una catálisis alcalina, en la cual se transesterifican los ácidos grasos esterificados al esqueleto de glicerol, no así los ácidos grasos libres que se convierten en sales de sodio solubles en agua. La solución de ácido clorhídrico metanólico derivatiza ambos ácidos grasos, los esterificados y los libres (Li & Watkins, 2001). En la Figura 11 se muestra la proporción de ácidos grasos presentes en el sebo nativo.

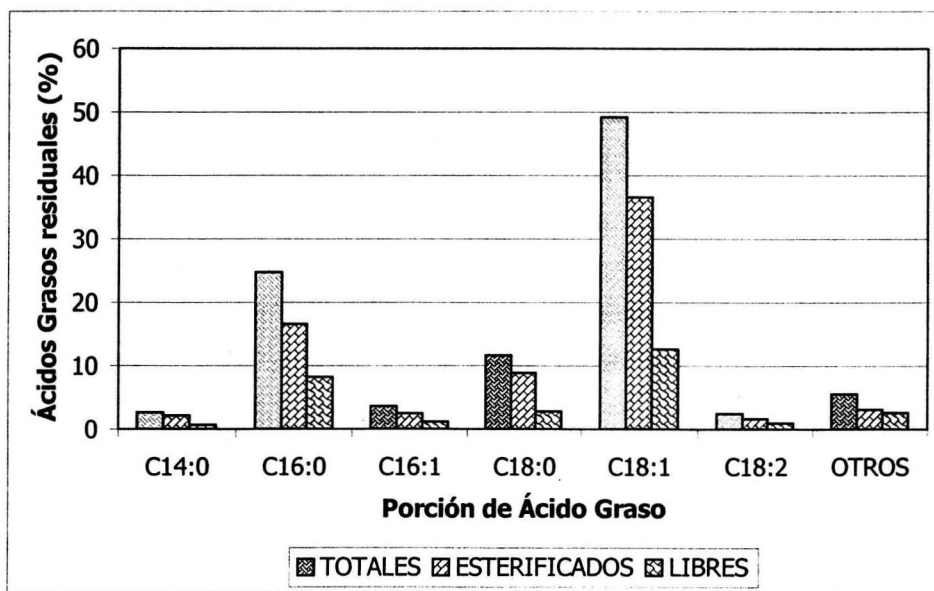


Figura 11. Composición de ácidos grasos del sebo nativo.

En el análisis de la muestra de sebo crudo se halló que el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0), son los dos ácidos grasos saturados más comunes. Los ácidos insaturados mayormente encontrados fueron el ácido

palmitoleico (16:1) y el ácido oleico (18:1). El sebo también contiene ácidos mirístico (14:0) y ácidos linoleico (18:2), pero en menor proporción, como se muestra en Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la composición de ácidos grasos en sebo vacuno (% peso).

ÁCIDO GRASO	ABREVIATURA	TEÓRICO ^a	EXPERIMENTAL ^b
Mirístico	14:0	2.9	2.69
Palmítico	16:0	25.8	24.74
Palmitoleico	16:1 (9)	2.0	3.65
Esteárico	18:0	21.5	11.58
Oleico	18:1 (9)	42.6	49.18
Linoleico	18:2 (9, 12)	2.3	2.53
Linolénico	18:3 (9, 12, 15)	0.2	No detectado
Otros	---	2.7	5.63 ^c

^a *National Renderers Association (www.dupps.com)*

^b Muestras proporcionadas por *National Renderers Association*.

^c Ácidos grasos no identificados.

4.3. Interesterificación enzimática de grasa de origen animal

La síntesis de lípidos modificados estructuralmente se llevó a cabo por su interesterificación con ácido linoleico vía enzimática en dos medios de reacción, con hexano y con dióxido de carbono supercrítico para comparar sus rendimientos de reacción.

La interesterificación catalizada por lipasa consiste en la hidrólisis de los grupos acilo seguido por la reesterificación de los ácidos grasos. Después de haber sido derivatizados los ácidos grasos de la mezcla de reacción por los métodos antes mencionados, se extrajeron con hexano, luego se concentraron bajo atmósfera de nitrógeno, redisolviéndose en 50µL de hexano y finalmente fueron inyectados en el cromatógrafo de gases para su análisis. El curso de la reacción se monitoreó mediante la incorporación (esterificación) del ácido linoleico al esqueleto de glicerol, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ \u00c1cido linoleico incorporado} = \frac{\text{ \u00c1rea de pico de \u00c1cido linoleico incorporado}}{\text{ \u00c1rea de pico de \u00c1cido linoleico total}} \times 100$$

La Figura 12 muestra el \u00c1cido linoleico incorporado durante la reacci\u00f3n en ambos medios. Se observan muy bajas incorporaciones de \u00c1cido linoleico en ambos medios de reacci\u00f3n durante las primeras 8 horas, posiblemente debido a que durante la primera etapa de interesterificaci\u00f3n la hidr\u00f3lisis de una porci\u00f3n de triacilglic\u00e9ridos es inhibida por el \u00c1cido linoleico libre que ser\u00e1 incorporado, ya que \u00e9ste compite con el agua por el sitio activo de la enzima (*Chowdary & Prapulla, 2002*).

Despu\u00e9s de que ha transcurrido este paso transitorio, *Godiers, et al., 1987* sugieren que la interesterificaci\u00f3n procede suavemente porque la disponibilidad de las mol\u00e9culas de agua para la hidr\u00f3lisis baja y tiende a permanecer en ese nivel de manera equilibrada. Probablemente despu\u00e9s de las 24 horas se desencadena la segunda etapa de la interesterificaci\u00f3n, la s\u00edntesis de \u00e9steres, que es favorecida por la baja disponibilidad de las mol\u00e9culas de agua o a la limitaci\u00f3n de sustrato lo cual quedar\u00e1 por experimentar.

La interesterificaci\u00f3n en hexano se desarroll\u00f3 lentamente y se encontr\u00f3 un m\u00e1ximo de \u00c1cido linoleico incorporado del 10.18% a las 30 horas. As\u00ed mismo, el aumento en el tiempo de reacci\u00f3n no mejor\u00f3 el nivel de incorporaci\u00f3n.

Sin embargo para la reacci\u00f3n con CO₂ supercr\u00edtico, la conversi\u00f3n fue sostenida alcanzando un nivel m\u00e1ximo de reacci\u00f3n de 27.46% a las 60 horas. Tal vez se deba a que la cantidad de triacilglic\u00e9ridos provenientes de la grasa animal se hayan agotado.

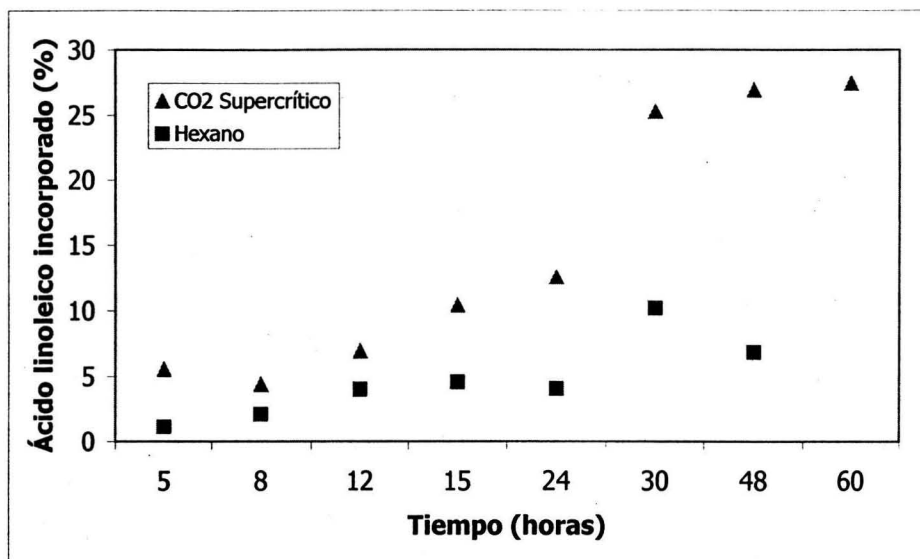


Figura 12. Interesterificación enzimática de grasa animal y ácido linoleico en hexano y CO₂ supercrítico a 55° C, 200 rpm.

Comparando los datos anteriores, podemos mostrar que el mayor rendimiento de interesterificación se obtuvo utilizando CO₂ supercrítico como medio de reacción.

Por medio de la curva estándar de éster metílico de ácido linoleico (Figura 13), se llevó a cabo una determinación más confiable de la concentración de ácido linoleico presente en cada una de las muestras tomadas para cada tiempo de reacción en fluido supercrítico.

En la Figura 14 se distingue un incremento en la concentración de ácido linoleico presente en la grasa conforme aumenta el tiempo de reacción. Antes de ser sometida al proceso de interesterificación enzimática (tiempo cero), la grasa contenía solamente 0.00874g de ácido linoleico esterificado por gramo de sebo. Después de 60 horas de interesterificación enzimática, la grasa incrementó su contenido de ácido linoleico y alcanzó 0.2142g AL/g sebo. Como se analiza más adelante, el cambio de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de la grasa animal afecta directamente su propiedad física de fusión.

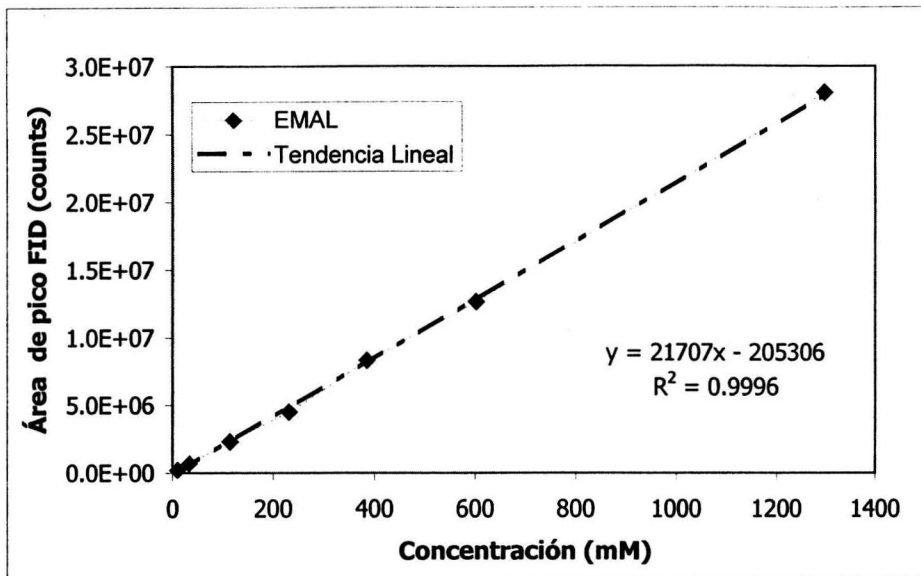


Figura 13. Curva patrón del éster metílico de ácido linoleico (EMAL).

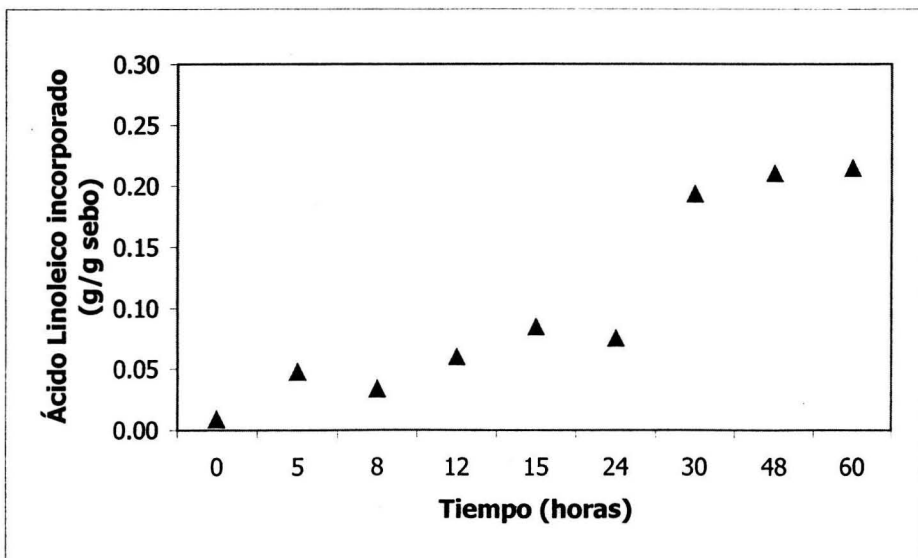


Figura 14. Interesterificación enzimática de ácido linoleico en grasa animal en CO_2 supercrítico a 350 bar, 55° C y 200 rpm.

4.4. Efectos asociados al contenido de agua (y la actividad acuosa)

Con base en la capacidad que presentó la lipasa Novozyme 435 para llevar a cabo la reacción de interesterificación en CO_2SC se estudió el efecto de la actividad acuosa sobre la reacción.

A partir de evidencias previas con otros sistemas enzimáticos, se conoce que el agua interfiere en reacciones de esterificación, más allá de un puro efecto producto de la ley de acción de masas. En otras palabras, las lipasas tienden a ser mejores catalizadores para reacciones de síntesis a bajos contenidos de agua, o más específicamente a actividades acuosas reducidas. En este sentido, se sabe que la disponibilidad de agua en el sistema de reacción puede afectar claramente la actividad enzimática, pues el agua puede servir no solo como solvente sino también como un reactivo en reacciones de hidrólisis (*Chowdary & Prapulla, 2002; Ma, et al. 2002*).

La actividad de agua es el mejor parámetro termodinámico que representa el nivel de hidratación de la enzima en un medio no acuoso. Por ello, se realizó la misma reacción de interesterificación en CO_2 supercrítico a las mismas condiciones, en función de cuatro diferentes a_w . Se utilizaron soluciones salinas para equilibrar la lipasa y el sebo a dos distintas actividades acuosas antes de la reacción, $a_w=0.356$ y $a_w=0.976$. El $a_w=0.059$ tanto de la enzima como del sebo se logró mediante una liofilización exhaustiva. El $a_w=0.554$ fue el valor que presentó la enzima en condiciones de almacenamiento en frío y una vez equilibrada a temperatura ambiente.

Cuando la lipasa y el sebo fueron preequilibrados a las actividades acuosas preespecificadas, el rendimiento de la interesterificación fue el esperado. A una menor actividad acuosa inicial ($a_w=0.05$) la lipasa B de *Candida antarctica* tuvo una mejor actividad catalítica, obteniendo un rendimiento de reacción de 20.44% de ácido linoleico incorporado. Mientras que a actividades acuosas iniciales por arriba de ésta, la reacción de interesterificación disminuyó, posiblemente debido a la actividad hidrolítica de la lipasa.

Si comparamos el ácido linoleico incorporado a los triacilglicéridos del sebo obtenido en CO₂ supercrítico a las mismas condiciones de reacción (15 horas, 55°C y 200 rpm) pero con diferentes actividades acuosas iniciales (Figura 15), encontramos que la interesterificación del sebo y ácido linoleico se duplicó (de 10.4% a 21.6%) al disminuir el a_w de 0.35 a a_w de 0.05. La alta sensibilidad de la reacción a variaciones en a_w es evidente.

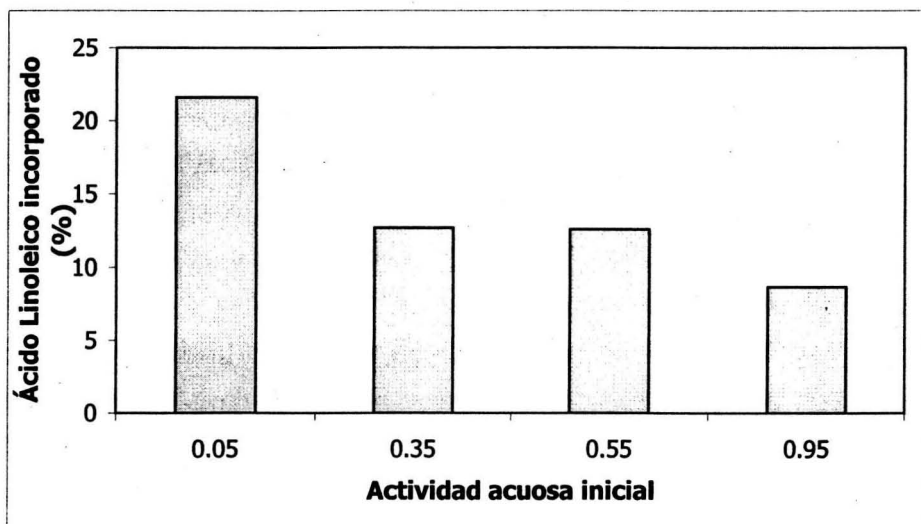


Figura 15. Efecto del contenido de a_w en la interesterificación con CO₂ supercrítico 15 h, 350 bar, 55° C y 200 rpm.

La lipasa pudo catalizar mejor la reacción de interesterificación a a_w bajos (cercana a cero), lo que indica que simplemente la humedad absorbida en las partículas de enzima parece ser suficiente para llevar a cabo la transformación de los triglicéridos.

Se han estudiado los efectos de la actividad acuosa sobre lipasas inmovilizadas y se ha encontrado que el agua rodea las partículas de catalizador e incluso puede llegar a formar capas más gruesas que las de la enzima (Vázquez Lima, et al., 1995); mientras más gruesa sea ésta película es más difícil para los

sustratos alcanzar las partículas enzimáticas por tanto a a_w altos se tiene menor rendimiento de reacción.

4.5. Modificaciones en la estructura del sebo

En cuanto a la comparación de propiedades del sebo tanto del sustrato original como el ya interesterificado se realizaron dos análisis a las muestras. El primero fue sobre el perfil de ácidos grasos presentes en las grasas y el segundo fue el punto de fusión de éstas.

En la Tabla 4 se presenta el perfil de ácidos grasos de la muestra de sebo extraída en fluido supercrítico comparado con el del sebo interesterificado enzimáticamente. Distinguimos una disminución del porcentaje de los ácidos grasos mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0) y oleico (18:1) en el sebo interesterificado debido a la esterificación del ácido linoleico en los triacilglicerolés del sebo como se esperaba. Esto se ve reflejado en el aumento del cociente entre ácidos grasos insaturados y saturados (AGI/AGS) y por tanto en su composición química y su comportamiento físico, lo que indica que se obtuvo una grasa modificada de mejores propiedades físicas, funcionales y organolépticas, pues contiene mayor cantidad de ácido linoleico esterificado. Por tratarse de lípidos con alto contenido de ácido graso poliinsaturado, pueden ser empleados como una fuente externa de ácido graso esencial que participa en diferentes procesos metabólicos que ayudan a reducir el colesterol e inhibir el proceso de trombosis arterial (*Ikeda, et al., 1991; Sellapan & Akoh, 2001*).

Este cambio de la propiedad AGI/AGS puede conducir a una diferencia en las propiedades físicas de la grasa y su intervalo de fusión puede ser un indicador de ello. Las grasas no presentan un punto de fusión exacto debido a que son mezclas de triglicéridos compuestas por una gran variedad de ácidos grasos, por lo que se determina un intervalo de fusión definido por dos temperaturas: la inicial cuando se empieza a ver fluidez de la grasa; y la temperatura final en la cual la muestra de grasa es líquida y nítida (*AOAC 920.157*).

Tabla 4. Análisis del sebo interesterificado con ácido linoleico en CO₂SC a las 15 h de reacción.

MUESTRA	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS (% AG)						AGI/AGS ^a
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	
Sebo	3.03	24.38	3.63	12.94	53.71	2.32	1.48
Sebo modificado	1.53	11.11	No detectado	8.12	26.50	52.74	3.82

^a Cociente entre ácidos grasos insaturados y ácidos grasos saturados

Debido a que la composición de los ácidos grasos del sebo ha sido modificada vía transesterificación enzimática, sus propiedades de fusión también han sido cambiadas, pues el tamaño de las cadenas de los ácidos grasos esterificados y su grado de insaturación lo alteran. Mientras mayor sea el número de insaturaciones que tengan los ácidos grasos esterificados al triglicérido, éste tendrá un punto de fusión más bajo.

Como se muestra en la Tabla 5, el intervalo de fusión es más amplio para el sebo nativo sin modificar, ya que comprende mayor contenido de ácidos grasos saturados. En cambio los lípidos modificados estructuralmente vía enzimática presentan un intervalo de fusión menor debido a que contienen una mayor proporción de ácido linoleico. Esto sugiere que la grasa obtenida en CO₂SC puede ser usada convenientemente en margarinas con punto de fusión medio (*Hamilton & Bhati, 1987*).

Esta última propiedad junto con el hecho de que las modificaciones son mediadas por enzimas y los materiales solo entran en contacto con CO₂SC, representa características de alta valía e interés en un proceso eventual industrial, pues su aprobación por órganos de regulación y de salud se obtendría sin mayor problema.

Tabla 5. Perfil del punto de fusión del lípido antes y después de la interesterificación enzimática.

MUESTRA	Temperatura de inicio de fusión (°C)	Temperatura de fusión final (°C)	Intervalo de fusión (°C)
Ácido linoleico	-8.0	-6.0	2.0
Sebo extraído con CO ₂ supercrítico	18.5	38.0	19.5
Sebo modificado en CO ₂ supercrítico	13.0	17.0	4.0

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se consiguió obtener una grasa con alto contenido de ácido linoleico a partir de triglicéridos de origen animal vía interesterificación enzimática, encontrando al CO_2SC como el medio más factible para llevar a cabo la reacción, comparado con el disolvente orgánico hexano.

Se determinó que la reacción de interesterificación enzimática es altamente sensible a los cambios de actividad acuosa, encontrando que a a_w bajos la lipasa tiende a ser mejor catalizador que a a_w altos.

Por medio del análisis del perfil de ácidos grasos e intervalo de fusión del derivado de grasa animal producido en condiciones supercríticas, se deduce que éste cuenta con mejores propiedades físicas y plásticas que la grasa original, presentando características para el uso comercial, por ejemplo margarinas y mantequillas modificadas de punto de fusión medio.

La combinación del uso de catalizadores biológicos con solventes naturales, como en el caso del CO_2SC , abre un campo amplio en el estudio de este sistema y los diversos factores que influyen sobre la estabilidad y actividad de las enzimas que facilitarían el conocimiento del papel que juega cada uno de ellos dentro del sistema.

Con esta misma metodología es posible desarrollar grasas o aceites con características nutricionales específicas. En un futuro próximo es de esperar que contemos con aceites comestibles con propiedades nutricionales, organolépticas y de estabilidad térmica adecuadas para cada uso culinario, que justificarán su inclusión en alimentos y productos dietéticos. Estas grasas o aceites serán elaborados a partir de lípidos estructurados y serán productos "a la medida" del consumidor.

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS

- Akho, C.C. & Min, D.B. *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Second edition. Marcel Dekker, Inc. USA (2002)
- Bailey, A.E. *Bailey's Industrial oil and fat products*. Edited by Swern, D. John Wiley & Sons, Inc. Fourth Edition. USA (1982)
- Balcão, V.M. & Malcata, F. X. Lipase-catalized modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 3:3161-169, (1997)
- Balcão, V.M. & Malcata, F. X. Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. *Enzyme Microb. Technol.*, 22:511-519, (1998)
- Bousquet-Dubouch, M.P.; Graber, M.; Sousa, N.; Lamare, S. & Legoy, M.D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim. Biophys. Acta*, 1550(1):90-99, (2001)
- Chao, R.R.; Mulvaney, S.J.; Bailey, M.E. & Huang, H. Fractionation of beef tallow with supercritical CO₂. En: *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. Edited by Rizvi, S.S.H. Chapman & Hall. London (1994)
- Chowdary, G.W. & Prapulla, S.G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.*, 38:393-397 (2002)
- Constant, J. Review. The role of eggs, margarines and fish oils in the nutritional management of coronary artery disease and strokes. *Keio J. Med.*, 53(3):131-136 (2004)
- Eder, K. Review. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.*, 671:113-131, (1995)
- Gandhi, N.N. Review. Applications of lipase. *JAOCS*, 74(6):621-634, (1997)
- Gandhi, N.N.; Patil, N.S.; Sawant, S.B.; Joshi, J.B. Lipase-Catalyzed Esterification. *Catal. Rev. – Sci. Eng.*, 42(4):439-480, (2000)

- Ghazali, H. M.; Hamidah, S. & Che Man Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with non-specific and 1,3-specific lipases. *JAOCS*, 72(6):633-639, (1995)
- Godiers, H.L.; Ampe, G.; Feyten, M.P.; Fouwé, B.L.; Guffens, W.M.; Van Cauwenbergh, S.M. & Tobback, P.P. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.* 30(2):258-266 (1987)
- Güçlü-Üstündağ, Ö. & Temelli, F. Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39:4756-4766, (2000)
- Hamilton, R.J. & Bhati, A. Recent advances in chemistry and fats oils. Elsevier Applied Science. USA (1987)
- Hammond. D.A.; Karel, M & Klibanov, A.M. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11:393-400, (1985)
- <http://www.dupps.com> National Renderers Association, Tallows and Greases. (Fecha de Consulta: Noviembre 2003)
- <<http://www.novozymes.com/>> Novozymes, Introduction to enzymatic interesterification. (Fecha de Consulta: Enero 2004)
- Hunter, J.E. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 36: 655-668, (2001)
- Ikeda, I.; Tomari Y.; Sugana, M.; Watanabe, A. & Nagata, J. Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. *Lipids*, 26:369, (1991)
- Kennedy, J. P. Structured lipids: Fats of the future. *Food Technol.*, 45:76-83, (1991)
- Li, Y. & Watkins, B. A. Analysis of Fatty Acids in Food Lipids. En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. USA (2001)

- Lucas, A.; Quinlan, P.; Abrams, S.; Ryan, S.; Meah, S. & Lucas, P.J. Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed.*, 77:F178-F184, (1997)
- Ma, L.; Persson, M. & Adlercreutz, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enz. Microb. Technol.* 31:1024-1029 (2002)
- Macrae, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *JAOCS*; 60(2):291, (1983)
- Marangoni, A. & Rousseau, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends Food Sci. & Technol.*, 6:329-335, (1995)
- Meijer, G.W. & Weststrate, J.A. Interesterification of fats in margarine: Effect on blood lipids, blood enzymes, and hemostasis parameters. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51: 527-534, (1997)
- Mesiano, A.J.; Beckman, E.J. & Russel, A.J. Supercritical Biocatalysis. *Chem. Rew.*, 99:623-633, (1999)
- Min kuo, T. & Gardner, H. W. *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. USA (2002)
- Nakamura, K.; Chi, Y.M.; Yamada, Y. & Yano, T. Lipase activity and stability in supercritical carbone dioxide. *Chem. Eng. Commun.*, 45:207-212, (1985)
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, 2001.
- Nilsson, W.B. & Hudson, J.K. Solubility of simple mixed triacylglycerols in supercritical CO₂. *JAOCS*; 70:8:749-754, (1993)
- *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Volume II. Edited by Patricia Cunniff. AOAC International. Chapter 41, p 4. USA (1996)
- Raldoph, T.W.; Blanch, H.W.; Prausnitz, J.M. & Wilke, C.R. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.*, 7(5):325-328, (1985)
- Reyes, H.R. & Hill C.G. Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, 43:171-182, (1994)

- Sellappan, S & Akoh, C.C. Synthesis of Structured Lipids by transesterification of Trilinolein Catalyzed by Lipozyme IM60. *J. Agric. Food Chem.*, 49:2071-2076, (2001)
- Shishikura, A.; Fujimoto, K.; Suzuki, T. & Arai, K. Improved lipase-catalyzed incorporation of long-chain fatty acids into medium-chain triglycerides assisted by supercritical carbon dioxide extraction. *JAACS*, 71:9:961-967, (1994)
- Sihvonen, M.; Järvenpää, E.; Hietaniemi, V. & Huopalahti, R. Advances in Supercritical carbon dioxide technologies. *Trends Food Sci. Technol.*, 10:217-222, (1999)
- Stender, S. & Dyerberg, J. Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.*, 48:61-66, (2004)
- Taylor, L. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons, Inc. USA (1996)
- Vázquez Lima, F.; Pyle, D.L. & Asenjo, J.A. Factors affecting the esterification of lauric acid using immobilized biocatalyst: enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 46(1):69-79 (1995)
- Uppenberg, J.; Patkar, S.A.; Bergfors, T. & Jones, T.A. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.*, 235:790-792, (1994a)
- Uppenberg, J.; Hansen, M.T.; Patkar, S. & Jones, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2:293-308, (1994b)
- Williams, J. P.; Khan, M.U. & Wong, D. A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty acids on di- and triglycerols using lipase and phospholipase A₂. *J. Lipid Res.*, 36:1407-1412, (1995)