



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CATALISIS ENZIMATICA EN LIQUIDO IONICO
HEXAFLUOROFOSFATO DE 1-BUTIL, 3-METILIMIDAZOL
COMO MEDIO DE REACCION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A :

Ioscani Jiménez del Val



MEXICO, D. F.

2006



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. MARTÍN GUILLERMO HERNÁNDEZ LUNA
Secretario	Prof. MARÍA EUGENIA COSTAS BASIN
1er. Suplente	Prof. PEDRO ROQUERO TEJEDA
2do. Suplente	Prof. MARÍA RAFAELA GUTIÉRREZ LARA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Asesor: EDUARDO BÁRZANA GARCÍA _____

Sustentante: IOSCANI JIMÉNEZ DEL VAL _____

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Bárzana por ser un amigo y un director de tesis ejemplar. ¡Mil gracias por tu apoyo!

A los miembros del jurado cuyas sugerencias y correcciones fueron indispensables para este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una carrera con excelencia.

A mi familia. Me han dado las lecciones más importantes. Me enseñaron a ser perseverante y a hacer las cosas bien. Gracias por el cariño y apoyo que siempre me han dado.

A Marina por estar ahí y darme y enseñarme tantas cosas.

A Adrián por ser un amigo inigualable. Ya van más de diez años y habrá muchos más. Gracias por ser mi hermano!

A Gonza, Eli, Juan, Rich y Xocho. Gracias por acompañarme a lo largo de este trayecto. Siempre me he considerado tan suertudo por tenerlos como amigos.

A Mau, Pete, Iván y Gaby. Gracias por estar ahí. Las cosas más importantes que aprendí en la Facultad fueron a su lado, o me las enseñaron ustedes. Gracias por la amistad y por hacer la Facultad tan divertida.

A Brenda, Polita, Rodolfo, Paco y Mauricio. El apoyo y amistad que recibí de ustedes desde el primer momento que llegué al laboratorio fue increíble. ¡Les agradezco tanto la amistad, las sugerencias y el apoyo!

Un agradecimiento especial a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, proyecto IN223305 por el apoyo económico brindado para la elaboración de esta tesis.

Otro agradecimiento especial para NOVO de México por tan amablemente facilitarnos los biocatalizadores empleados en éste trabajo.

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	4
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Planteamiento del problema.....	6
1.2. Hipótesis.....	8
1.3. Objetivos	8
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	9
2.1. Carotenoides	9
2.2. Capsaicinoides	13
2.3. Lipasas	14
2.4. Líquidos Iónicos	16
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOLOGIA	22
3.1. Materiales.....	22
3.2. Metodología.....	24
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANALISIS.....	29
4.1. Análisis de muestras	29
Figura 11. Cromatograma de Capsaicinoides	30
4.2. Variación del contenido de agua	36
4.3. Variación de viscosidad modificando contenido de agua y temperatura ..	39
4.4. Cálculos.....	40
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA.....	45

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Indice de Figuras

Figura 1. Principales carotenoides del chile guajillo.....	11
Figura 2. Proceso industrial para la extracción de carotenoides del chile guajillo	12
Figura 3. Principales capsaicinoides del chile guajillo.....	13
Figura 4. Hidrólisis enzimática de la capsaicina (Reyes-Duarte <i>et al.</i> , 2000)	14
Figura 5. Estructura básica de líquidos iónicos con el catión imidazol.....	17
Figura 6. [bmim][PF ₆].....	18
Figura 7. Viscosidad del [bmim][PF ₆] en función de la fracción mol de agua.....	20
Figura 8. Dependencia de la viscosidad (η) del [bmim][PF ₆] con temperatura ...	21
Figura 9. %w/w H ₂ O vs. a_w para [bmim][PF ₆] (Berberich <i>et al.</i> , 2003)	26
Figura 10. Preparación del biocatalizador para reacción	27
Figura 11. Cromatograma de Capsaicinoides.....	30
Figura 12. Cromatograma con separación de Vainillilamina.....	31
Figura 13. Detalle del cromatograma con separación de Vainillilamina.....	32
Figura 14. Espectros observados con el DAD	33
Figura 15. Curva Patrón de Vainillilamina.....	34
Figura 16. Curva Patrón de Capsaicina	35
Figura 17. Conversión de Capsaicinoides	38

Indice de Tablas

Tabla 1. Miscibilidad del [bmim][PF ₆] con diferentes disolventes orgánicos a T=25°C.....	25
Tabla 2. Relación %mol/mol, %wt/wt y %V/V de agua en [bmim][PF ₆].....	36
Tabla 3. Variación de la conversión en función de la viscosidad	39

RESUMEN

En el presente trabajo, se estableció la factibilidad de llevar a cabo la hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* en el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-butil, 3-metilimidazol ([bmim][PF₆]) como medio.

La reacción se llevó a cabo con la presentación inmovilizada de la lipasa B de *Candida antarctica* conocida comercialmente como NOVOZYME 435. La concentración inicial de amidas de capsaicinoides [CAP] que se utilizó fue de 1g/L. La relación biocatalizador-sustrato empleada fue de 10g_{NOVO435}/g_{CAP}. El líquido iónico utilizado como medio de reacción fue [bmim][PF₆] con 99% de pureza. Las reacciones se llevaron a cabo a 25°C, 50°C y 70°C con el fin de observar el efecto de la temperatura. Los efectos del contenido inicial de agua del líquido iónico y la actividad acuosa del biocatalizador sobre el rendimiento de la reacción fueron estudiados. La conversión de sustrato a producto se cuantificó al cabo de 72 horas por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Con esta técnica analítica se determinó el decremento de sustratos (amidas de capsaicinoides), así como aparición de producto de reacción (vainillilamina).

La conversión máxima observada fue del 21.68% mol/mol con respecto a capsaicina. Esta conversión se observó a 70°C, con una actividad acuosa inicial del biocatalizador $a_{wi} = 0.953$, y a condiciones de saturación del [bmim][PF₆] con agua ($C_{H_2O} = 33.7\%$ mol/mol). También se observó que al aumentar el contenido de agua del medio, aumenta la conversión. Se estableció que este efecto es debido a una mejora en las propiedades de transporte del medio y no a un efecto cinético.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Los colorantes naturales han cobrado gran importancia en la industria debido a las restricciones que se han impuesto para el uso de pigmentos sintéticos dirigidos al consumo humano, puesto que éstos han sido reconocidos, en algunas instancias, como carcinogénicos (Lea, 1982; Crowley, 2003). Una fuente importante de pigmentos rojos para la industria mexicana de colorantes naturales es el chile guajillo (Santamaría *et al.*, 2000). Los colorantes más abundantes en el chile guajillo son la capsantina y la capsorubina. Estos colorantes se obtienen industrialmente por dos métodos: secando el chile y pulverizándolo, produciendo lo que llamamos paprika, o llevando a cabo una extracción con disolventes orgánicos para producir una oleorresina rica en pigmentos rojos (Jaren-Galan *et al.*, 1999). Es evidente que el primer método genera un producto con aplicaciones extremadamente limitadas. La oleorresina obtenida con éste proceso tiene una gran variedad aplicaciones, por ejemplo, en la industria de los alimentos como aditivo para mejorar el color de la carne de los salmónidos (Ingle de la Mora, 2003), en la industria farmacéutica como agente antioxidante y nutracéutico para una variedad de afecciones (Van den Berg *et al.*, 2000) y en la industria cosmética como colorante (Derera *et al.*, 2005). Sin embargo, un problema importante que presenta éste proceso de extracción es, precisamente, el uso de disolventes orgánicos. Aún cuando se lleve a cabo una remoción exhaustiva del disolvente empleado, siempre quedan trazas, las cuales son, en muchos casos, nocivas para el consumo humano (Jaren-Galán *et al.*, 1999). Para contrarrestar éste problema, se ha propuesto el uso de otros medios para llevar a cabo la extracción de los pigmentos. El medio que más interés ha generado a nivel investigación es el dióxido de carbono en estado supercrítico.

El CO₂-SC es excelente para llevar a cabo la extracción de pigmentos para consumo humano gracias a que cuenta con excelentes propiedades de transporte, es muy poco polar (lo cual es excelente considerando que los pigmentos son altamente hidrofóbicos) y las condiciones operativas para obtenerlo son moderadas. Sin embargo, el uso de este medio para la extracción de pigmentos del chile guajillo acarrea un problema importante. Debido a la gran difusividad con la que cuenta el CO₂-SC, otros compuestos se ven arrastrados al momento en el que extrae los pigmentos del chile guajillo (Jarén-Galán *et al.*, 1999). Entre los compuestos que se ven extraídos están las amidas de los capsaicinoides, en particular, la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Esta familia de compuestos son los responsables de la pungencia, o picor, del chile. El problema es obvio: si la oleoresina resultante de la extracción contiene amidas de capsaicinoides, ésta es pungente; en consecuencia, las aplicaciones del producto son limitadas. Debido a este problema, se ha propuesto la hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides en medios compatibles con el sistema de extracción con CO₂ en estado supercrítico, y con los cuales se respeten los lineamientos establecidos para productos de consumo humano. Con este fin, se propuso probar el uso de líquidos iónicos como medio para esta reacción. Más específicamente, se ha propuesto el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-butil, 3-metilimidazol ([bmim][PF₆]) como medio para la hidrólisis enzimática de las amidas de los capsaicinoides ya que es un líquido iónico bien tipificado y la miscibilidad del CO₂ a altas presiones en él es muy alta (Blanchard *et al.*, 2001). La expectativa del uso de este líquido iónico es proponer un sistema de extracción-reacción (Blanchard *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 2003) con el cual se extraigan los colorantes con el CO₂-SC, éstos se arrastren al líquido en el cual se encuentre el biocatalizador, se lleve a cabo la reacción enzimática y, finalmente, se obtenga una oleoresina libre de pungencia. La primera etapa requerida para cumplir con éste objetivo es probar la factibilidad de la hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides en el líquido iónico [bmim][PF₆] y establecer las variables que controlan la reacción.

1.2. Hipótesis

La reacción de hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides en el líquido iónico [bmim][PF₆] presentará ventajas en comparación con los medios orgánicos previamente estudiados.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

- Evaluar la capacidad del líquido iónico [bmim][PF₆] como medio para la reacción de hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides catalizada por lipasas comerciales.

1.3.2. Particulares

- Establecer los niveles máximos de conversión cuando se utiliza el líquido iónico [bmim][PF₆] como medio.
- Estudiar el efecto del contenido de agua del líquido iónico y la actividad acuosa (a_w) del biocatalizador sobre la reacción de interés.
- Establecer las variables de operación más relevantes que controlan la hidrólisis de las amidas de los capsaicinoides cuando se utiliza [bmim][PF₆] como medio.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

1.1. Carotenoides

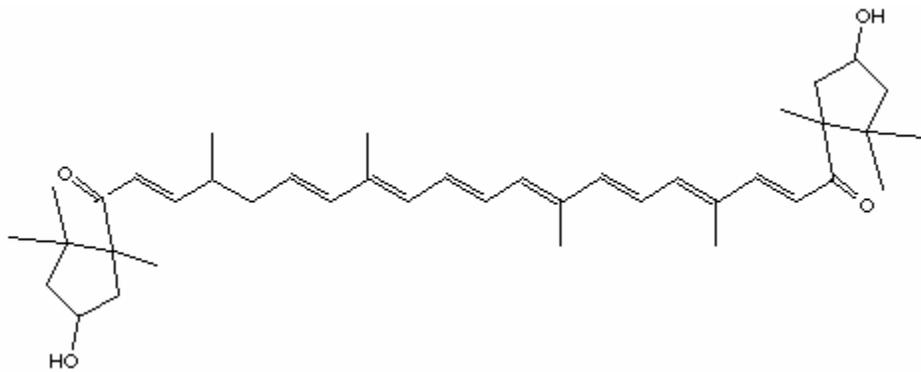
Los pigmentos naturales han desplazado a los colorantes sintéticos en la industria de los alimentos debido a los problemas que éstos últimos presentan para el consumo humano. Este fenómeno ha resultado en que la legislación tienda a eliminar los colorantes artificiales y sustituirlos por pigmentos naturales (Lea, 1982; Crowley, 2003). Por ello, es necesario que se propongan procesos rentables para la explotación de dichos pigmentos. Una de las familias de pigmentos naturales más importante es la de los carotenoides. Los carotenoides son increíblemente abundantes en la naturaleza. Se estima que se producen 100 millones de toneladas de carotenos en la naturaleza anualmente (Rodríguez-Amaya, 1997).

Los carotenoides son la familia de moléculas que son responsables del color amarillo, anaranjado y rojo de frutos, raíces, flores, invertebrados y peces. La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno lineal, simétrico de 40 carbonos, construido a partir de 8 unidades isoprenoides de 5 carbonos cada una ordenada de tal manera que el orden se invierte al centro. Esta estructura básica se puede encontrar modificada de varias maneras: hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, isomerización, funcionalización con oxígeno o la combinación de éstas. Se han aislado y caracterizado alrededor de 600 carotenoides naturales (Rodríguez-Amaya, 1997).

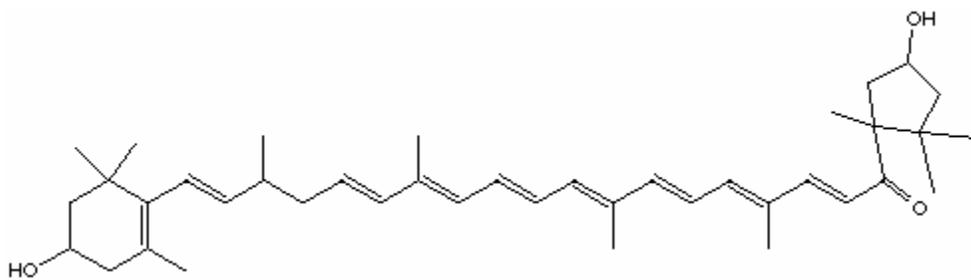
Los carotenoides cuentan con propiedades muy interesantes; por ejemplo, su actividad como precursor de la vitamina A y su actividad antioxidante. También se ha reportado que los carotenoides generan efectos inmunomoduladores y tienen un papel en la morfogénesis y la diferenciación celular. Existen varios estudios en los cuales se ha observado un efecto positivo del consumo de carotenoides en relación a enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y enfermedades oculares como las cataratas y la

degeneración macular (Matsufuji *et al.*, 1998). Cabe mencionar que la Luteína y la Zeaxantina son los principales componentes del pigmento macular (van den Berg, *et al.* 2000). Por dichos beneficios, se considera que los carotenoides son sustancias nutraceuticas, (e.g. parte de un alimento, capaz de proporcionar beneficios en la salud, incluidos la prevención y el tratamiento de enfermedades [Astiasarán y Martínez, 1999]).

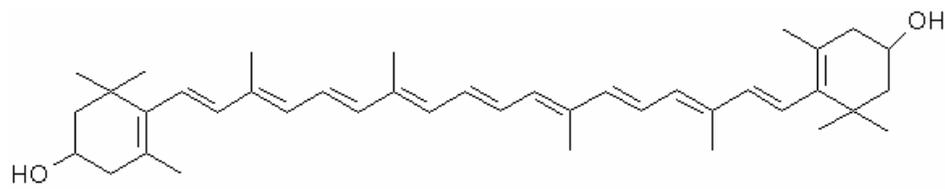
En la industria mexicana de colorantes naturales, una fuente importante de carotenoides es el chile guajillo (*Capsicum annuum* L.). Este chile se utiliza para producir un pigmento de color rojo. Los carotenoides más abundantes en el chile guajillo son la capsorubina, la capsantina, la zeaxantina y el β -caroteno.



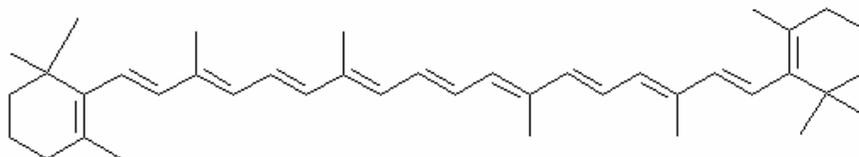
Capsorubina



Capsantina



Zeaxantina



β-Caroteno

Figura 1. Principales carotenoides del chile guajillo

Los colorantes extraídos se comercializan secos (páprika) o como componentes mayoritarios de la oleorresina resultante de su extracción con hexano. El contenido de pigmentos de la oleorresina depende de la variedad del género *Capsicum*. El chile guajillo es la fuente más recurrida para la obtención de estos compuestos en la industria de colorantes Mexicana debido a su bajo contenido de capsaicinoides (Santamaría *et al.*, 2000). Industrialmente, la obtención de los pigmentos se lleva a cabo mediante la extracción con hexano. A continuación se presenta una descripción esquemática del proceso industrial utilizado para la extracción de pigmentos del chile (Jarén-Galán *et al.*, 1999; Ausich y Sanders, 1997).

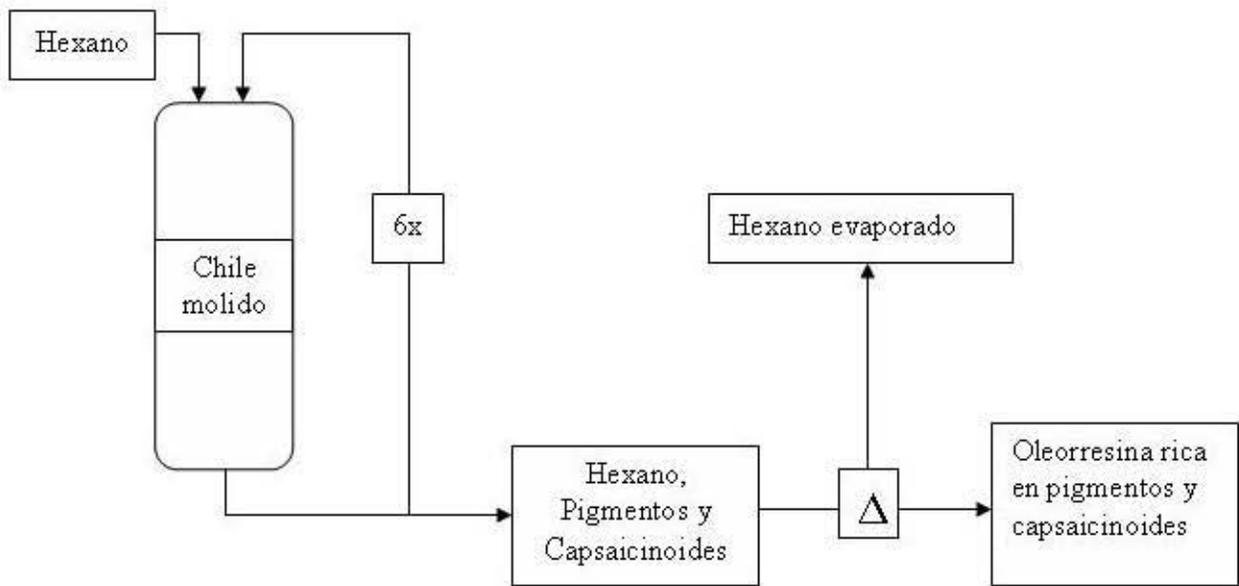
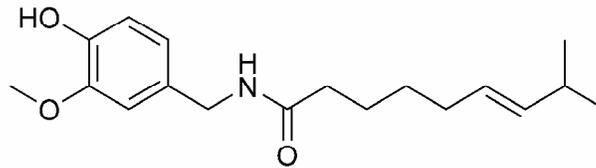


Figura 2. Proceso industrial para la extracción de carotenoides del chile guajillo

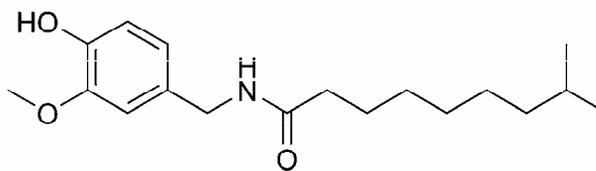
Se debe hacer hincapié en el proceso de calentamiento posterior a la extracción. El calentamiento se da para retirar el excedente de disolvente que se pudiera presentar en el producto. El problema que presenta dicho calentamiento es que los carotenoides, en presencia de temperaturas moderadas y oxígeno, tienden a oxidarse, lo cual resulta en una pérdida considerable de color y, en consecuencia, de actividad (Jarén-Galán, 1999).

1.2. Capsaicinoides

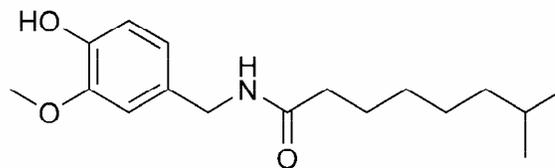
Las amidas de los capsaicinoides son los compuestos responsables de la pungencia de los chiles (García *et al.*, 1995). Los capsaicinoides más abundantes en el chile guajillo son la capsaicina, la dihidrocapsaicina y la nordihidrocapsaicina.



Capsaicina



Dihidrocapsaicina



Nordihidrocapsaicina

Figura 3. Principales capsaicinoides del chile guajillo

Estos capsaicinoides se encuentran en proporciones variables dependiendo de la variedad del género *Capsicum*; sin embargo, se trabajó con una preparación comercial cuya composición se aproxima a 60% Capsaicina, 35% Dihidrocapsaicina y 5% Nordihidrocapsaicina.

La capsaicina, el capsaicinoide más común, tiene propiedades farmacológicas interesantes. Se ha observado que es un agente que previene mutaciones y formación de tumores (Surh *et al.*, 1995) y estimula la secreción de ácido gástrico. También se ha utilizado por sus propiedades como analgésico tópico. A nivel molecular, el enlace que le confiere la propiedad de pungencia a los capsaicinoides es el enlace amida (Winter *et al.*, 1995). A pesar de estos efectos positivos y contemplando el uso industrial de los colorantes derivados del género *Capsicum* para la industria farmacéutica y de los alimentos, es indeseable que existan capsaicinoides mezclados con los pigmentos por razones obvias. Debido a esto, se ha propuesto llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las amidas de los capsaicinoides con el fin de eliminar la pungencia del producto final (Reyes-Duarte *et al.*, 2000), pero al mismo tiempo manteniendo las propiedades de los pigmentos.

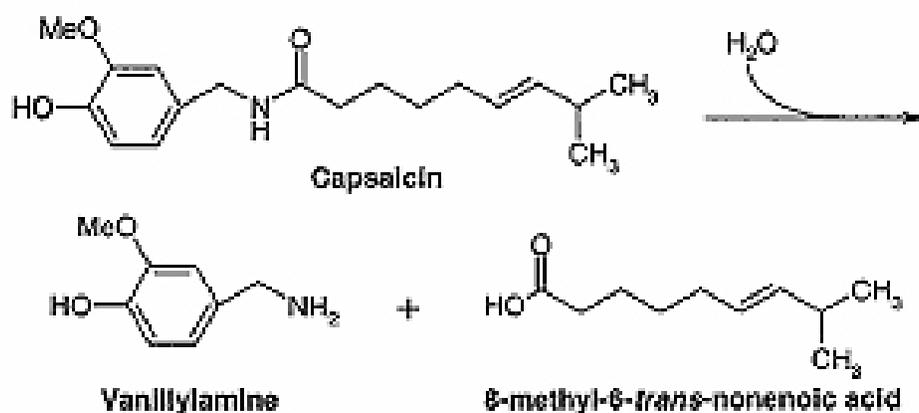


Figura 4. Hidrólisis enzimática de la capsaicina (Reyes-Duarte *et al.*, 2000)

1.3. Lipasas

Las enzimas se han utilizado ampliamente en la industria para catalizar reacciones químicas. Ha surgido gran preferencia por éste tipo de catalizadores debido a la gran variedad de ventajas que presentan. Las enzimas son altamente enantioselectivas y son altamente enantioespecíficas. La

enantioselectividad, o estereoselectividad, se define como la formación preferencial de un estereoisómero sobre otro en una reacción química (IUPAC, 2006). La enantioespecificidad, o estereoespecificidad se refiere a la preferencia del catalizador para actuar sobre un estereoisómero sobre otro (IUPAC, 2006). En la industria farmacéutica y de los alimentos, ambas características son de suma importancia, ya que se ha observado que ciertos estereoisómeros producen efectos adversos. Un ejemplo claro de esto es la Talidomida de los años cincuenta y sesenta. Este fármaco se recetó para la náusea típica en mujeres embarazadas y un estereoisómero producido por la síntesis química de la Talidomida generó malformaciones en sus hijos. Por otro lado, las propiedades ópticas de los compuestos son función de su isomería. Si no se cuida ésta propiedad de los pigmentos, los productos derivados pueden contar con propiedades diferentes a las deseadas. Con el reciente uso de enzimas para catalizar reacciones químicas, éste tipo de efectos negativos puede ser evitado, especialmente en la elaboración de productos para consumo humano.

Las lipasas son enzimas que han cobrado gran interés por sus amplias aplicaciones en la industria. Las lipasas son enzimas obtenidas principalmente de bacterias, levaduras y hongos. Este tipo de enzimas tienen capacidad de catalizar gran cantidad de reacciones relacionadas con la hidrólisis y formación de enlaces tipo éster. Además han probado ser muy activas en medios no-acuosos del tipo de los disolventes orgánicos.

La levadura *Candida antarctica* produce dos lipasas denominadas A y B. La lipasa A es poco específica y más termoestable que la lipasa B. Cuenta con un peso molecular de 45kDa y un punto isoeléctrico (P_i) de 7.5. La lipasa B de *Candida antarctica* es una enzima altamente estereoespecífica para hidrólisis y síntesis orgánica, tiene un peso molecular de 33kDa y un $P_i = 6.0$. Se utiliza en la industria para síntesis de triglicéridos, transesterificaciones, preparación de enantiómeros, síntesis de glucolípidos, entre otros (Gandhi, 1997). La lipasa B

de *Candida antarctica* (CALB) se comercializa inmovilizada bajo el nombre Novozyme 435 por la empresa Novozymes A/S de Dinamarca.

1.4. Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos son definidos como sales orgánicas que se encuentran en estado líquido por debajo de los 100°C. Los líquidos iónicos se conocen desde 1914; sin embargo, recientemente, se comenzó a probar su uso en técnicas analíticas, electroquímica y como medio de reacción.

Desde que Zaks y Klibanov descubrieron en 1983 que las enzimas trabajaban en medios no acuosos, se han llevado a cabo gran cantidad de reacciones catalizadas enzimáticamente en disolventes orgánicos. Muchas de estas reacciones mostraron mejoras en comparación a los medios en los que tradicionalmente se llevaban a cabo. Una de las mayores ventajas al utilizar disolventes orgánicos como medio para reacciones enzimáticas es la posibilidad de disolver sustratos hidrofóbicos en el medio para que la enzima lleve a cabo su trabajo. A pesar de estas grandes ventajas, las desventajas de utilizar disolventes orgánicos como medio de reacción son evidentes. La gran mayoría de disolventes orgánicos son altamente volátiles, son inflamables, son nocivos para el medio ambiente y en ocasiones, la separación de estos compuestos en la industria farmacéutica daña los productos finales (Nara *et al.*, 2002). Debido a este tipo de problemas, se han probado otros medios de reacción. Entre los medios que más atención han cobrado en los últimos cinco años se encuentran los líquidos iónicos.

Desde mediados de los años noventa se han utilizado los líquidos iónicos en síntesis orgánica, en electroquímica y, en el año 2000, se corroboró la posibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticamente catalizadas en dichos medios (Erbeldinger *et al.*, 2000).

En el año 2000 también se propone a los líquidos iónicos como “disolventes verdes”, debido a que los líquidos iónicos presentan presión de vapor despreciable, no son inflamables, son muy poco reactivos, son altamente reciclables y favorecen extracciones líquido-líquido (Seddon *et al.*, 2000). Al igual que los disolventes orgánicos, muchas de las reacciones catalizadas con enzimas que se han llevado a cabo en líquidos iónicos han presentado ventajas como mayor selectividad por el sustrato, mayor enantioespecificidad, mayor estereoespecificidad, y mayor estabilidad térmica de la enzima (De Diego *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2003; Kaar *et al.*, 2003; Sheldon *et al.*, 2002). En unísono con estas ventajas, es propio mencionar la mayor ventaja con la que cuentan los líquidos iónicos. Se menciona en la literatura que los líquidos iónicos son “disolventes de diseñador” (Seddon *et al.*, 2000) ya que sus capacidades para disolver compuestos está dada por su estructura molecular. Los líquidos iónicos que más se han utilizado como alternativa a los disolventes orgánicos son aquellos derivados a partir del anillo de imidazol.



Figura 5. Estructura básica de líquidos iónicos con el catión imidazol

Como se ilustra en la figura 5, n es el número de carbonos en el sustituyente alquílico en la posición 1 del anillo de imidazol y X es un catión con carga fuertemente deslocalizada. Si se considera que n puede tener valores de uno a doce para que la sal resultante sea líquida y que aparte de los mostrados, existen por lo menos diez aniones más, esto resulta en una cantidad posible de 168 líquidos iónicos a partir exclusivamente del anillo de imidazol. Por otro lado,

existen, por lo menos, otras cuatro estructuras fundamentales de cationes, que son, alquilamonios, alquifosfonios, alquilsulfonios, pirrolidionios y N-alquilpirridinios. En la literatura, se habla de una cantidad posible teórica de líquidos iónicos del orden de los millones (Welton, 1999; Brennecke *et al.*, 2001). Esto contrasta con los 300 disolventes orgánicos más utilizados en la industria (Huddleston *et al.*, 2001). Todos éstos líquidos iónicos cuentan con capacidades muy distintas y diferenciadas para disolver un gran número de compuestos. Se ha reportado que la miscibilidad del líquido resultante con agua es más dependiente del catión, y la polaridad del líquido está más relacionada con el sustituyente en el anillo imidazol. Por ejemplo, el anión tetrafluoroborato hace que el líquido iónico con $n=4$ sea totalmente miscible con agua y por otro lado, su análogo, pero con el anión $[\text{PF}_6]^-$ es solo parcialmente miscible con agua y ambos tienen la capacidad de disolver compuestos con la misma polaridad (Huddleston *et al.*, 2001). Con la variabilidad mostrada en el esquema anterior se considera que los líquidos iónicos son sintetizables en función de lo que se les quiera disolver.

Es necesario mencionar que una gran desventaja que presentan estos compuestos es su altísima viscosidad. Los líquidos iónicos más comunes tienen una viscosidad de por lo menos 100cP a 25°C (Harris y Wolf, 2005), lo cual nos indica que habría posibles limitaciones en cuanto a transferencia de masa durante la reacción.

El líquido iónico más estudiado de esta familia es el Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazol, o $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$. La estructura de este compuesto es:



Figura 6. $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$

Se han reportado reacciones de alcoholisis, amoniólisis, acilación enantioselectiva, politransesterificación y perhidrólisis catalizadas con lipasa tipo B de *Candida antarctica* en [bmim][PF₆]. Generalmente, estas reacciones han presentado rapidez comparables, o mejores que en disolventes orgánicos. (Lozano *et al.*, 2003; Kaar *et al.*, 2003; Sheldon *et al.*, 2002).

A pesar de ser el líquido iónico más estudiado, existe información limitada en cuanto a sus propiedades como medio de reacción. La información más relevante para éste trabajo es la referente a su viscosidad en función de temperatura y contenido de agua. Seddon, *et al.* (2000) reportaron que la viscosidad del [bmim][PF₆] decrece exponencialmente en función de la fracción mol de agua que contiene según la siguiente correlación:

$$\eta = \eta_s \cdot e^{-\frac{x_{H_2O}}{0.19}}$$

en la cual η_s representa la viscosidad del [bmim][PF₆] puro a 20°C y x_{H_2O} es la fracción mol de agua en el [bmim][PF₆]. El coeficiente de correlación con los datos experimentales es de 0.97. La gráfica correspondiente a ésta ecuación se muestra a continuación.

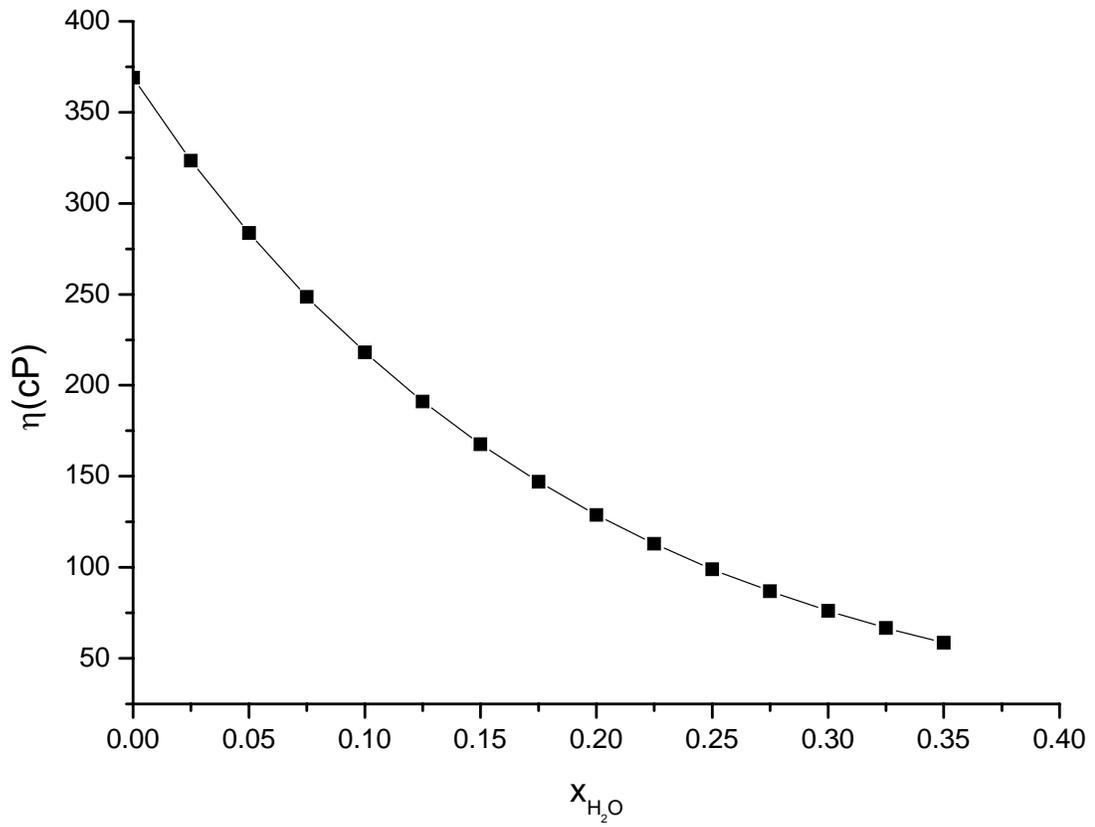


Figura 7. Viscosidad del [bmim][PF₆] en función de la fracción mol de agua

Por otro lado se reporta que la viscosidad del [bmim][PF₆] decrece también exponencialmente en función de la temperatura:

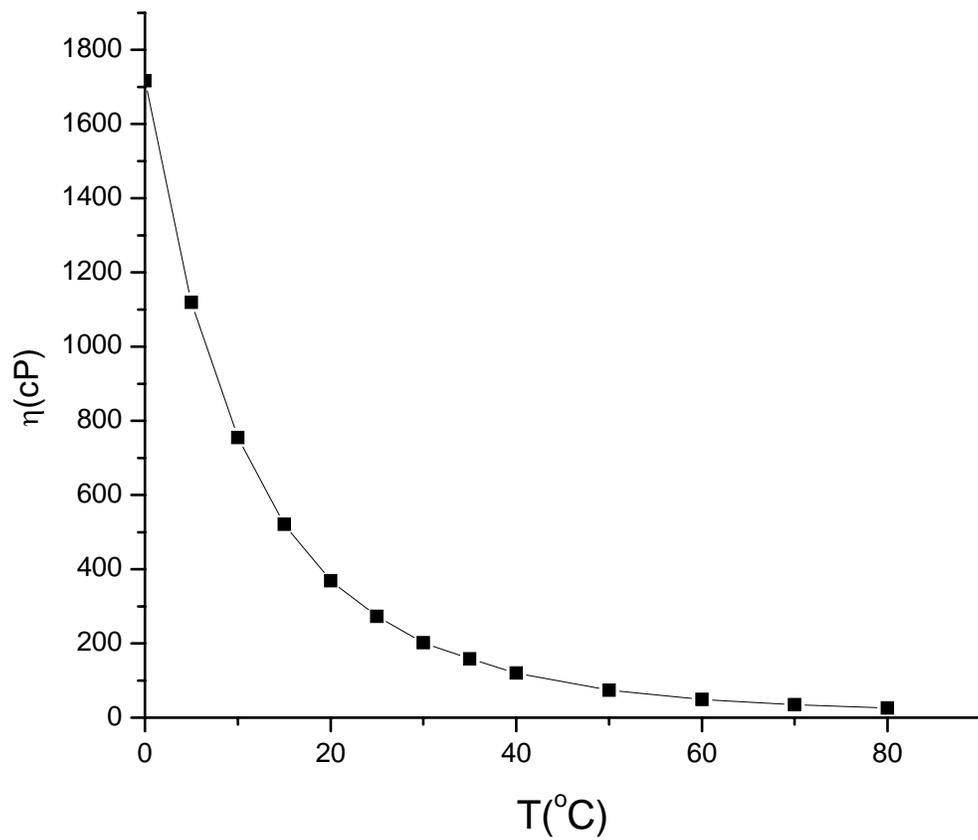


Figura 8. Dependencia de la viscosidad (η) del [bmim][PF₆] con temperatura (Harris y Woolf, 2005).

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOLOGIA

1.1. Materiales

1.1.1. Equipo de Laboratorio

- Se utilizó un HPLC de Hewlett Packard serie 1100 con bomba cuaternaria, acoplado a un detector de arreglo de diodos (Palo Alto, CA, EUA).
- Las columnas empleadas para HPLC fueron Waters Symmetry C18, con diámetro de partícula de 3.5 μ m, la primera con dimensiones de 4.6 x 150mm y la segunda de 3.9 x 150mm (Waters Chromatography [Milford, MA, EUA]).
- Un rotavapor BUCHI (Flawil, Suiza) se utilizó para el reciclaje del [bmim][PF₆].
- Se utilizó un equipo Karl Fischer Mettler Toledo (Greifensee, Suiza) para monitorear contenido de agua en las muestras mediante titulación de yodo.
- La liofilizadora utilizada para retirar el exceso de agua y disolventes para el reciclaje del líquido iónico fue Heto FD1.0 de la empresa Heto-Holten A/S (Alferod, Dinamarca).
- El Laboratorio 313 del Edificio E de la Facultad de Química fue muy amable al facilitarnos su Reómetro de Deformación Controlada, modelo ARES RFSIII de marca TA Instruments (New Castle, DE, EUA) para la determinación de la viscosidad del líquido iónico.

1.1.2. Consumibles

- La mezcla de capsaicinoides se compró de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). La composición de la mezcla se corroboró en un trabajo previo (Landa, 2005) y se estableció como 64.3% w/w de Capsaicina, 33.6% w/w de Dihidrocapsaicina y 2.1% w/w de Nordihidrocapsaicina.
- Los estándares de Capsaicina y Vainillilamina también se adquirió de Sigma-Aldrich Co. El líquido iónico [bmim][PF₆] se obtuvo de Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Alemania) con pureza mayor al 96%.
- El biocatalizador empleado fue la lipasa B de *Candida antarctica* aislada e inmovilizada sobre una resina acrílica que se distribuye comercialmente con el nombre de NOVOZYME 435. La actividad específica reportada de éste biocatalizador es de 10,000 PLU/g. La NOVOZYME 435 fue amablemente facilitada por NOVO de México.
- El disolvente empleado para el reciclaje del [bmim][PF₆] fue dietil éter 99.8% puro de J.T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc. [Phillipsburg, NJ, EUA]).
- El disolvente utilizado para HPLC fue acetonitrilo grado HPLC de J.T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc. [Phillipsburg, NJ, EUA]).
- Agua desionizada con el equipo purificador de agua SIMPLICITY de la empresa Millipore Co. (Billerica, MA, EUA).

1.2. Metodología

Debido a que el uso de los líquidos iónicos como medio de reacciones catalizadas enzimáticamente es un campo de desarrollo reciente, las metodologías empleadas fueron establecidas específicamente para el proyecto. Estas pueden ser clasificadas en tres grupos principales: reciclaje del líquido iónico, preparación de las reacciones y análisis de muestras.

1.2.1. Reciclaje del Líquido Iónico

Una de las ventajas más importantes que presentan los líquidos iónicos es su alto grado de reuso. El método más utilizado para el reciclaje de los líquidos iónicos es la extracción líquido-líquido. Para aplicar éste método, se debe buscar un disolvente que no sea miscible con el líquido, pero que tenga la capacidad de disolver al compuesto que se desea transferir. La solubilidad de los capsaicinoides en diferentes disolventes ha sido reportada. Los capsaicinoides son solubles en etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, dietil éter, éter de petróleo y benceno (Santamaría *et al.*, 2000). La siguiente tabla muestra la miscibilidad de ciertos disolventes orgánicos en el líquido iónico [bmim][PF₆].

Disolvente	Constante Dieléctrica $\langle \epsilon \rangle$	Miscibilidad en [bmim][PF₆]
Agua	80.1	Inmiscible
Carbonato de propileno	64.4	Miscible
Metanol	33.0	Miscible
Acetonitrilo	26.6	Miscible
Etanol	24.3	Miscible
Acetona	20.7	Miscible
Cloruro de metileno	8.93	Miscible
Tetrahidrofurano	7.58	Miscible
Dietil éter	4.34	Inmiscible
Tricloroetileno	3.39	Inmiscible
Disulfuro de carbono	2.64	Inmiscible
Tolueno	2.38	Inmiscible
Hexano	1.90	Inmiscible

Tabla 1. Miscibilidad del [bmim][PF₆] con diferentes disolventes orgánicos a T=25°C

Debido a la disponibilidad de disolventes en el laboratorio, y haciendo las consideraciones adecuadas con la información presentada anteriormente, se eligió al dietil éter como disolvente para llevar a cabo el reciclaje del [bmim][PF₆].

Para establecer la metodología, se disolvió la mezcla de capsaicinoides en el líquido iónico y se llevaron a cabo extracciones líquido-líquido con éter. Al cabo de cada extracción, se analizó tanto el extracto como el líquido iónico por HPLC con el fin de determinar su contenido de capsaicinoides. Se determinó que al cabo de cinco extracciones consecutivas, se remueven casi en su totalidad los capsaicinoides del líquido iónico.

El reciclaje del líquido iónico, en este caso, consiste en llevar a cabo cinco extracciones líquido-líquido en un embudo de separación de 250mL. Posteriormente, y con el fin de purificar el líquido iónico después de la extracción, se disuelve en acetona y se lleva al rotavapor en donde se deja destilando a presión reducida a 70°C durante dos horas. Al cabo de este paso,

se lleva el líquido a la liofilizadora, en la cual se evapora, por presión reducida, el excedente de acetona, agua y éter.

1.2.2. Preparación de Reacciones

La metodología final desarrollada en este trabajo para la preparación de reacciones fue simple y consistió en pesar 10mg de capsaicinoides en un reactor de vidrio enchaquetado de 50mL. Posteriormente, se agregaron 13.7g (10mL) de [bmim][PF₆] al reactor y se añadió el agua necesaria para alcanzar la actividad acuosa deseada con base en la isoterma mostrada en la figura 9.

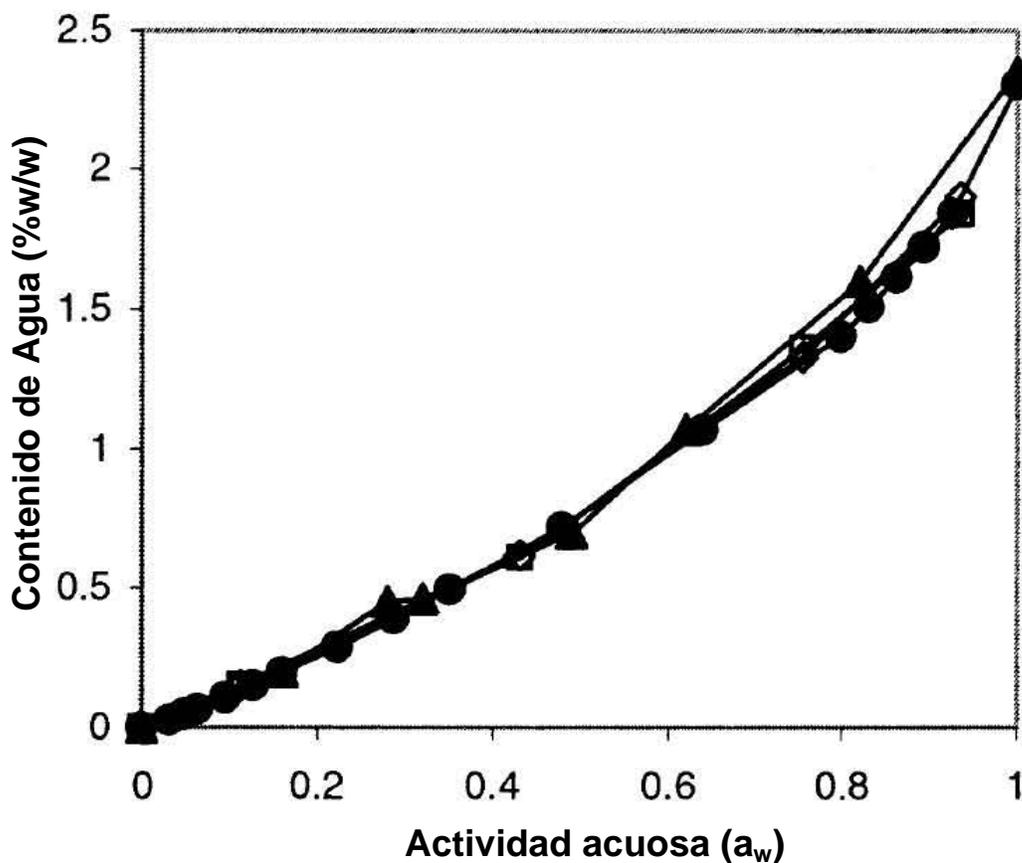


Figura 1. %w/w H₂O vs. a_w para [bmim][PF₆] (Berberich *et al.*, 2003)

Finalmente, se agregó al reactor una bolsa de material poroso la cual contenía 100mg de biocatalizador (con a_w previamente ajustada por incubación en cámara con solución salina sobresaturada) y el agitador magnético como se muestra en la figura 10. La temperatura se controló mediante la circulación de agua a temperatura constante por la chaqueta del reactor y la agitación se llevó a cabo mediante una parrilla magnética.

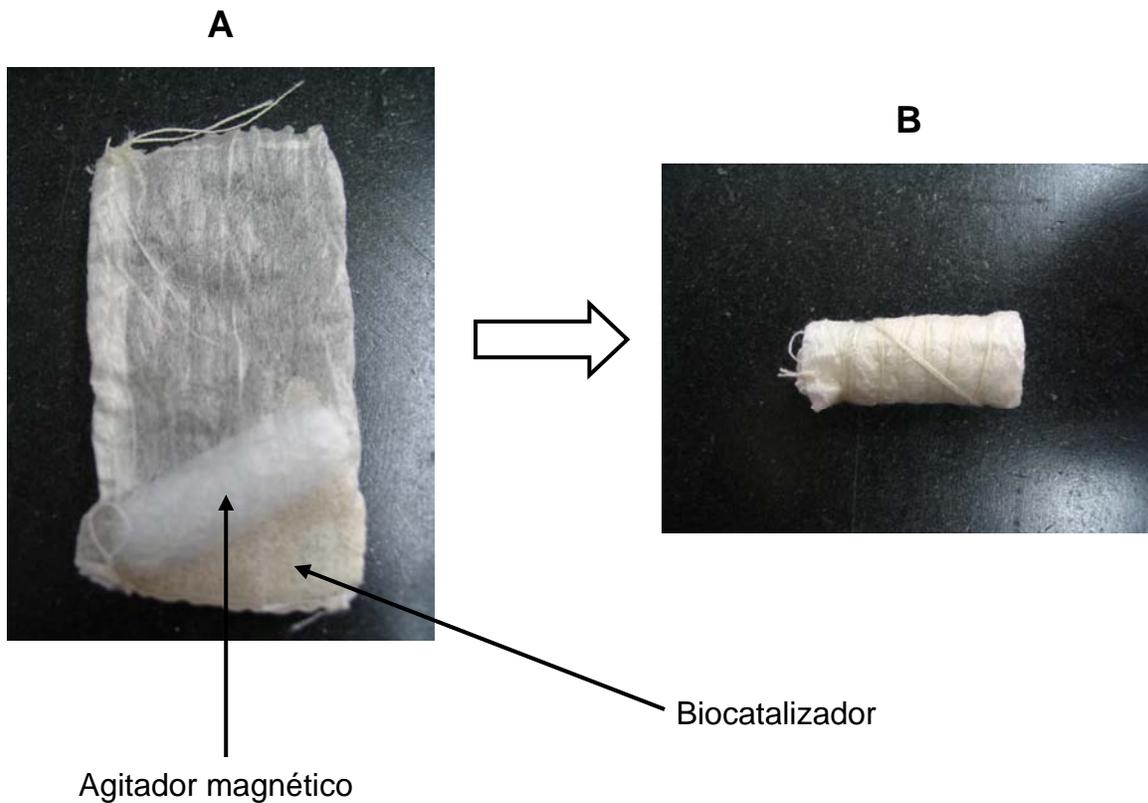


Figura 2. Preparación del biocatalizador para reacción

En la imagen A, se observa el agitador magnético y el biocatalizador dentro de la bolsa porosa sin enrollar. En la imagen B, se observa el paquete enrollado.

1.2.3. Técnica Cromatográfica

La metodología para analizar amidas de capsaicinoides mediante HPLC se reportó en trabajos previos (Hoffman *et al.*, 1983; Minguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993). Sin embargo, dicha metodología tuvo que ser modificada dada la presencia del [bmim][PF₆]. Con el fin de separar con mayor definición al líquido iónico del producto de la reacción, se programó al equipo de tal forma que hubiera un gradiente de polaridad de los disolventes. Más específicamente, la separación cromatográfica comienza con una composición de fase móvil de 70% v/v de agua, 30% v/v de acetonitrilo. Con esta composición, se ven separados el líquido iónico de la vainillilamina. A partir del minuto 5 de inyección, la composición de fase móvil cambia inmediatamente a 70% v/v de acetonitrilo y 30% v/v de agua. Con esta composición, se separan las amidas de los capsaicinoides. La detección de los compuestos se llevó a cabo con el detector de arreglo de diodos ajustado para leer a 280nm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANALISIS

1.1. Análisis de muestras

En las figuras 11 y 12 se presentan cromatogramas representativos. El primer cromatograma corresponde a la técnica original para cuantificar capsaicinoides establecida en el trabajo (Hoffman *et al.*, 1983; Minguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993). El segundo cromatograma corresponde a la adaptación de la técnica anterior que se estableció con el fin de separar el producto de reacción (vainillilamina) del líquido iónico.

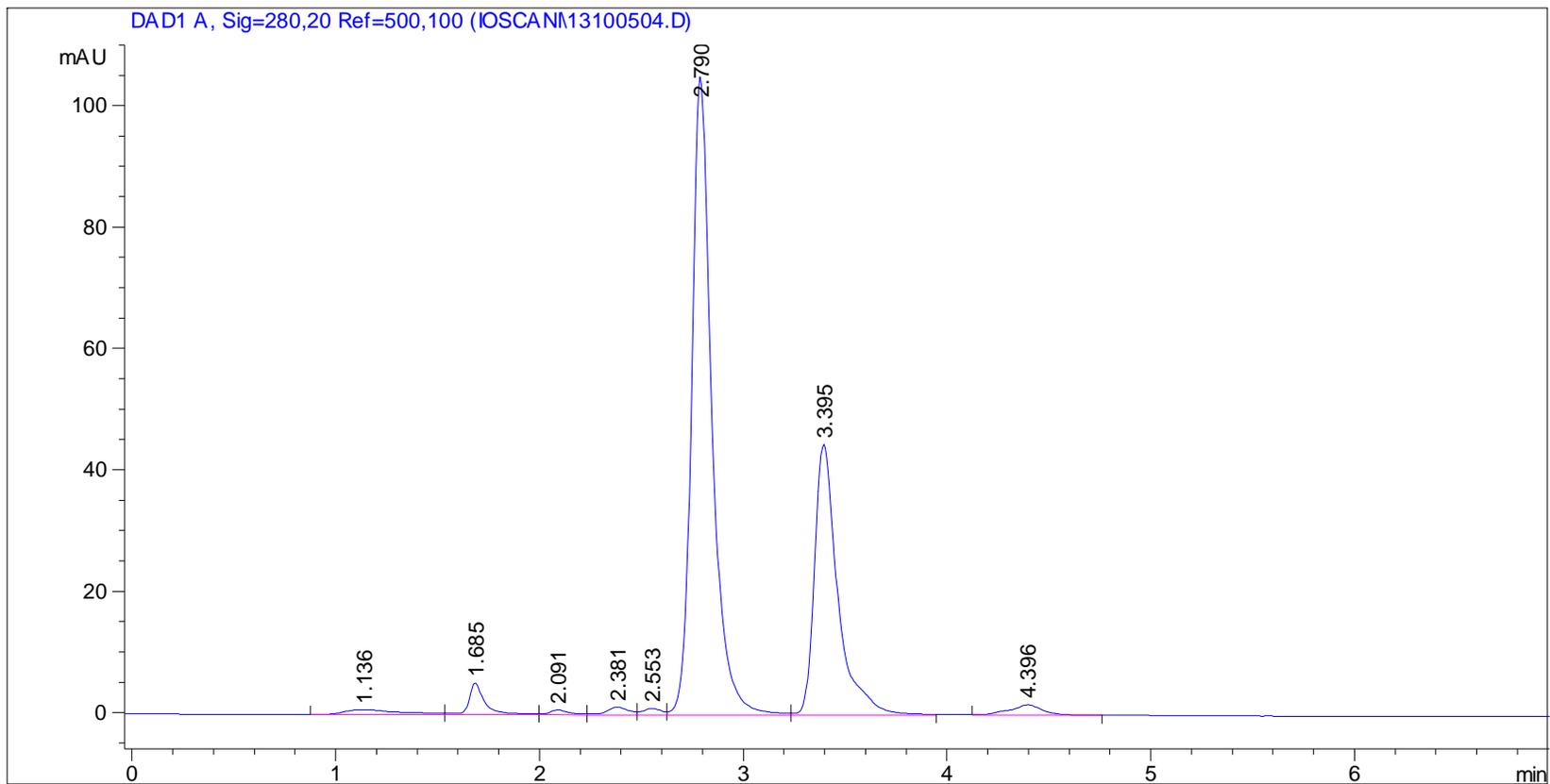


Figura 1. Cromatograma de Capsaicinoides

El pico a 2.790min corresponde a Capsaicina, el pico a 3.395min corresponde a Dihidrocapsaicina y el pico a 4.396min corresponde a Nordihidrocapsaicina. No se presenta un pico para vainillilamina.

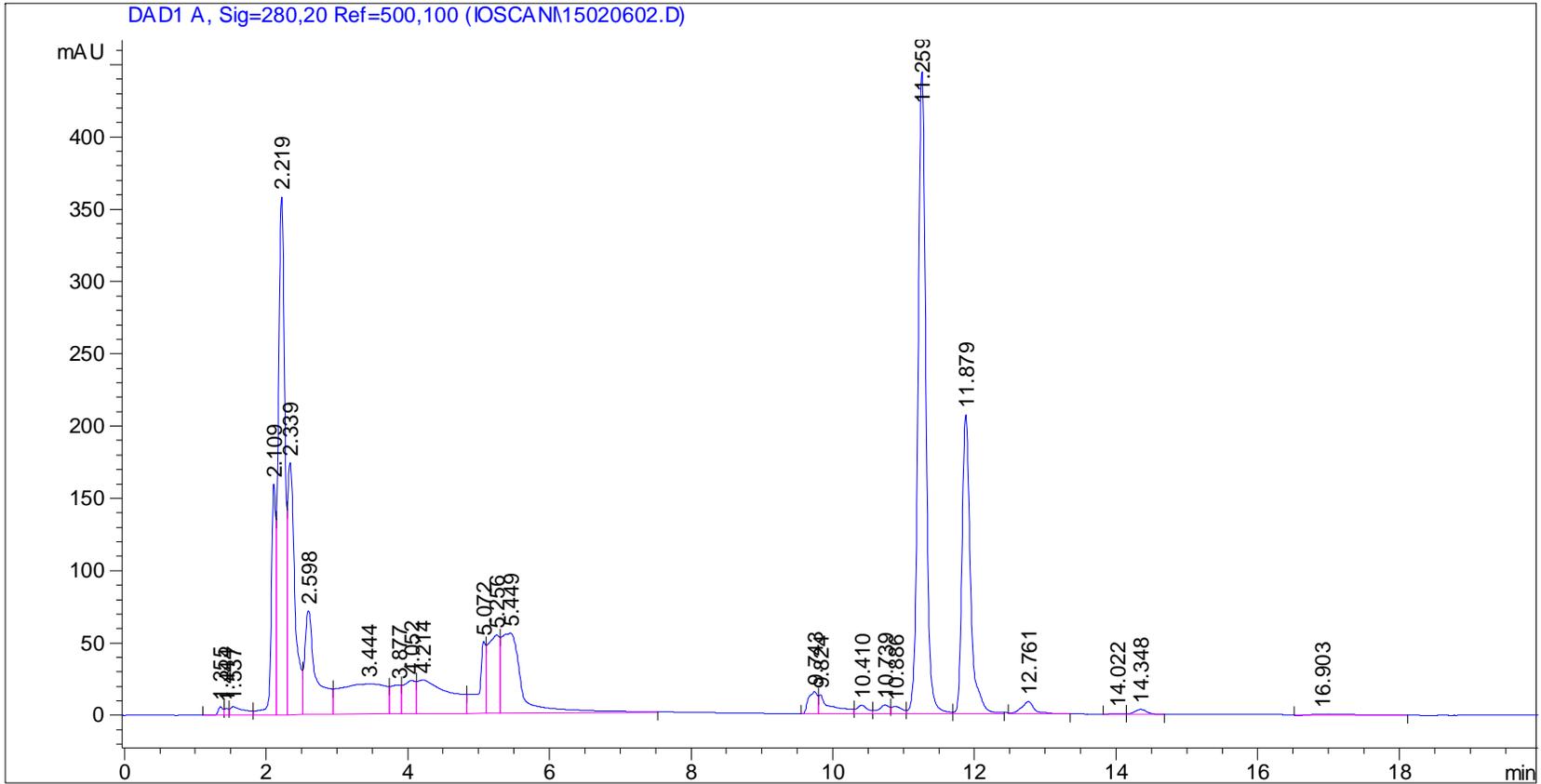


Figura 2. Cromatograma con separación de Vainillilamina

En la figura 12 se presenta un cromatograma que corresponde a la técnica modificada para cuantificación de Capsaicinoides y Vainillilamina. El pico que se observa a tiempo de retención de 2.339min corresponde a Vainillilamina.

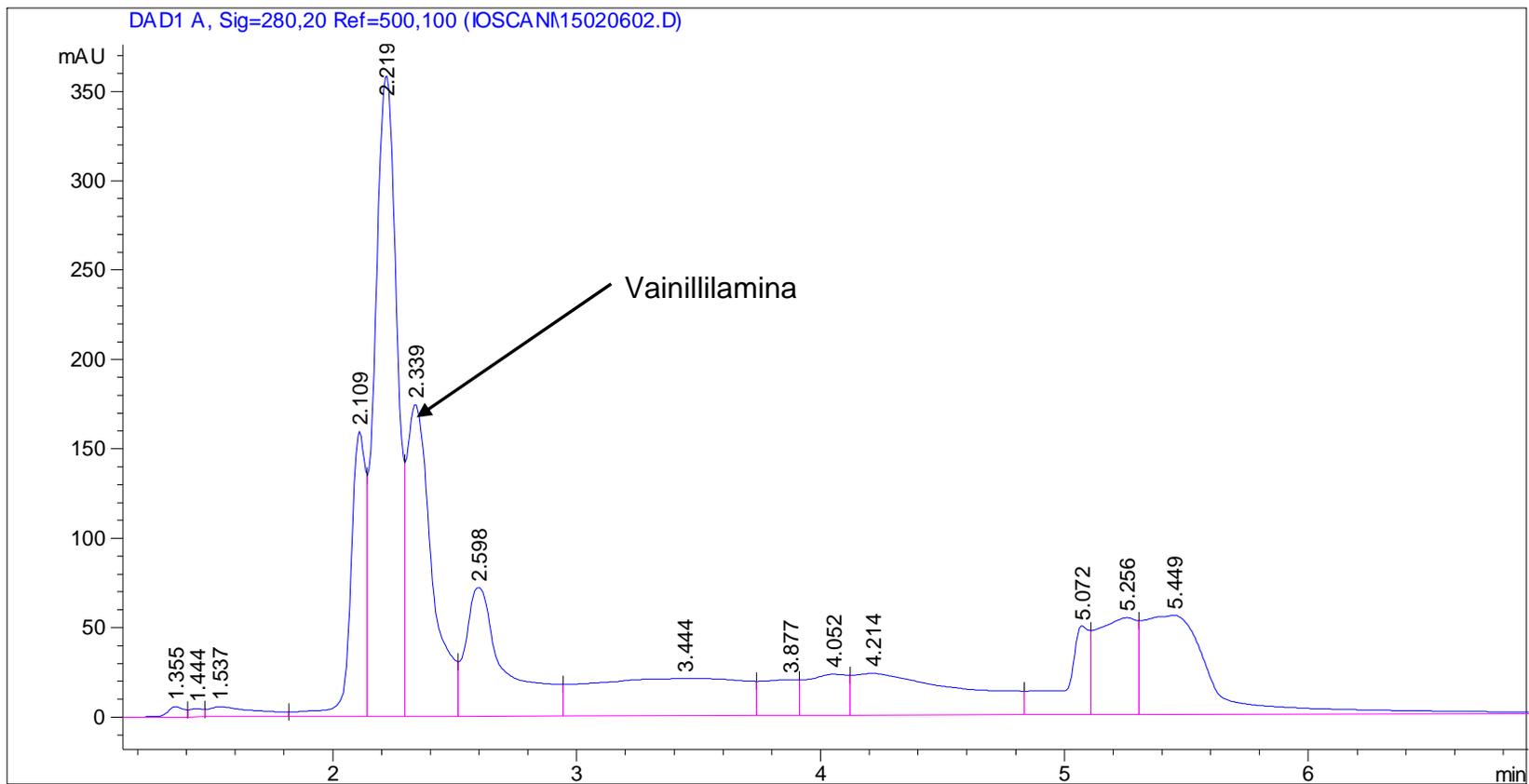


Figura 3. Detalle del cromatograma con separación de Vainillilamina

En la figura 13 se muestra un detalle del cromatograma anterior en el cual se observa la separación adecuada de la Vainillilamina.

La identificación del pico, cuyo tiempo de retención es 2.330min, como vainillilamina fue gracias al detector de arreglo de diodos con el cual es posible detectar el espectro del compuesto correspondiente al pico. A continuación se compara el espectro del pico cuyo $t_{ret}=2.339min$ con aquel del estándar de Vainillilamina. Se observa que ambos espectros son prácticamente idénticos.

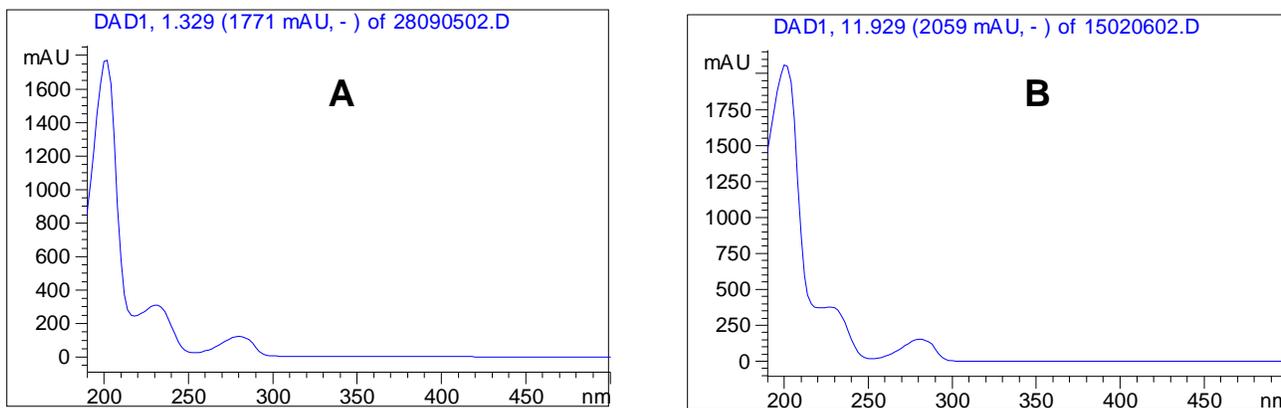


Figura 4. Espectros observados con el DAD

El espectro A corresponde al estándar de vainillilamina y el B corresponde al pico con $t_{ret}=2.339min$

La cuantificación de reactivos y productos se llevó a cabo mediante la elaboración de curvas patrón. Estas se hicieron para capsaicina y vainillilamina. A continuación se presentan ambas curvas.

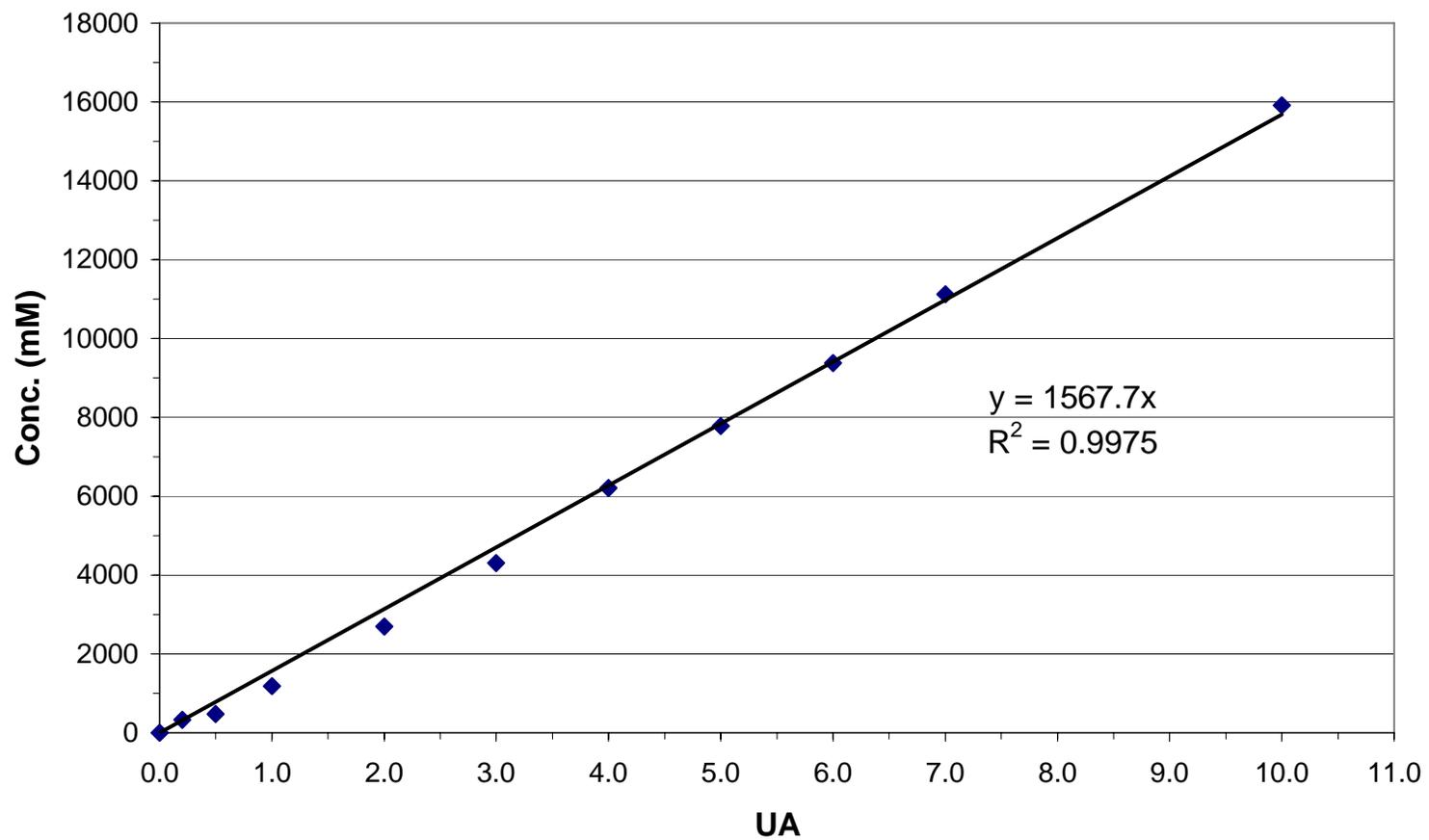


Figura 5. Curva Patrón de Vainillilamina

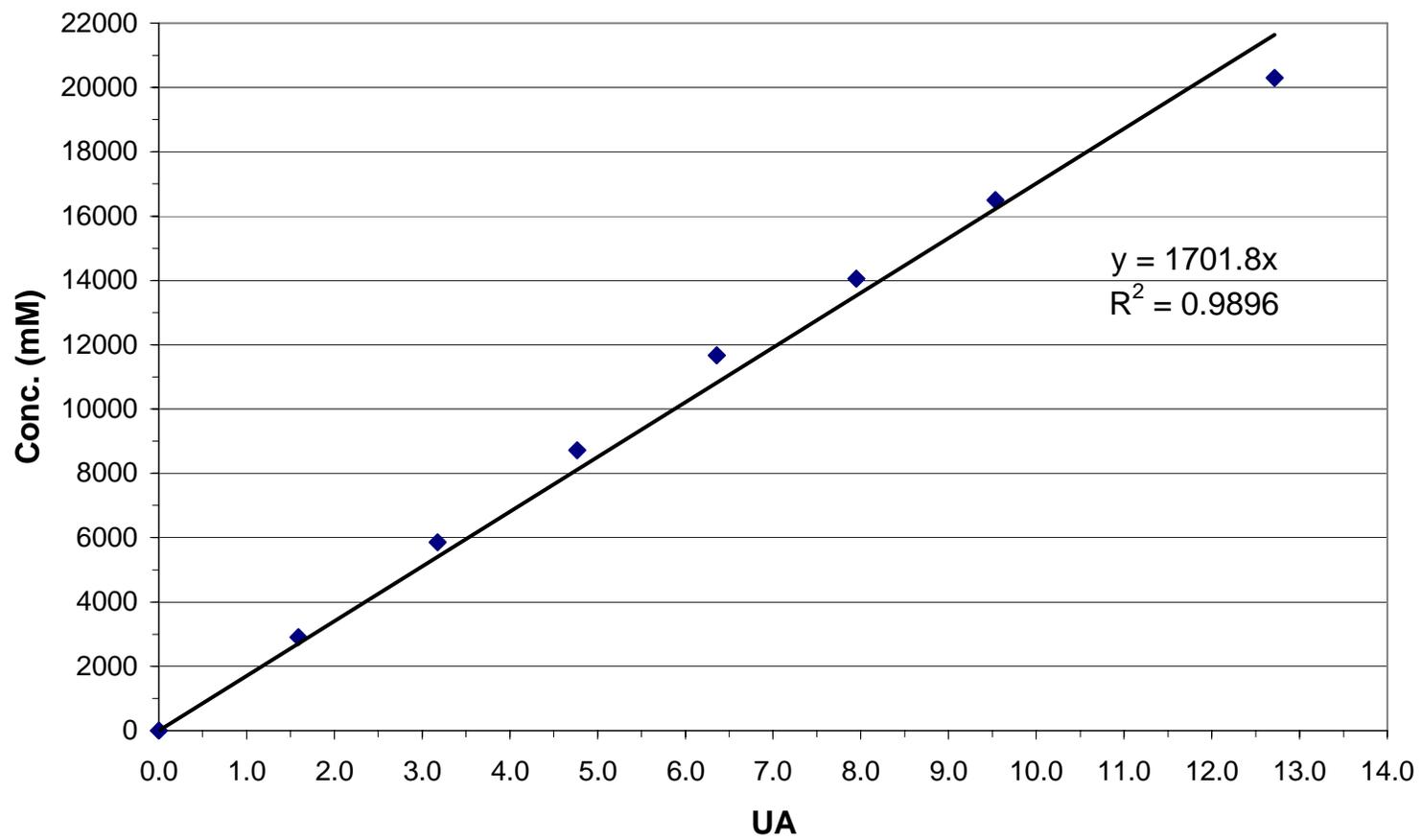


Figura 6. Curva Patrón de Capsaicina

1.2. Variación del contenido de agua

Los resultados que se presentarán a continuación son a concentración inicial de sustrato $[CAP]_0 = 1\text{mg/mL}$ de mezcla de capsaicinoides, a $T=70^\circ\text{C}$, tiempo total de reacción de 72 horas y $10\text{mg}_{\text{NOVO435}}/\text{mL}$. Se varió el contenido de agua del líquido iónico para cada reacción. La relación de diferentes contenidos de agua se presenta a continuación.

Reacción	%H ₂ O($\frac{\text{mol}}{\text{mol}}$)	%H ₂ O($\frac{\text{wt}}{\text{wt}}$)	%H ₂ O($\frac{\text{V}}{\text{V}}$)	a _w Teórica (@ 25°C)
R1	2.370	0.151	0.207	0.1
R2	2.370	0.151	0.207	0.1
R3	1.154	0.073	0.100	0.05
R4	14.025	1.01	1.372	0.65
R5	17.166	1.274	1.737	0.675
R6	33.695	3.066	4.172	>1.0*
R7	7.292	0.487	0.666	0.5
R8	7.292	0.487	0.666	0.5
R9	25.110	2.045	2.780	≈1.0
R10	33.860	3.088	4.182	>1.0*
Control	33.860	3.088	4.182	>1.0*

Tabla 1. Relación %mol/mol, %wt/wt y %V/V de agua en [bmim][PF₆]

***NOTA:** Estos valores exceden la saturación del [bmim][PF₆] con agua, sin embargo, debido a que la temperatura de reacción es mayor a 25°C y que la solubilidad de agua en el [bmim][PF₆] aumenta con la temperatura, sigue existiendo una sola fase.

Para las condiciones de temperatura, relación biocatalizador/sustrato, concentración inicial de sustrato y tiempo de reacción se mantuvieron los reportados previamente para disolventes orgánicos (Reyes-Duarte *et al.*, 2000). Cada reacción reportada se llevó a cabo por duplicado. Como control se empleó enzima inactivada, es decir, la NOVO435 se esterilizó en autoclave a 120°C durante dos horas. Los resultados se presentan en la figura 17.

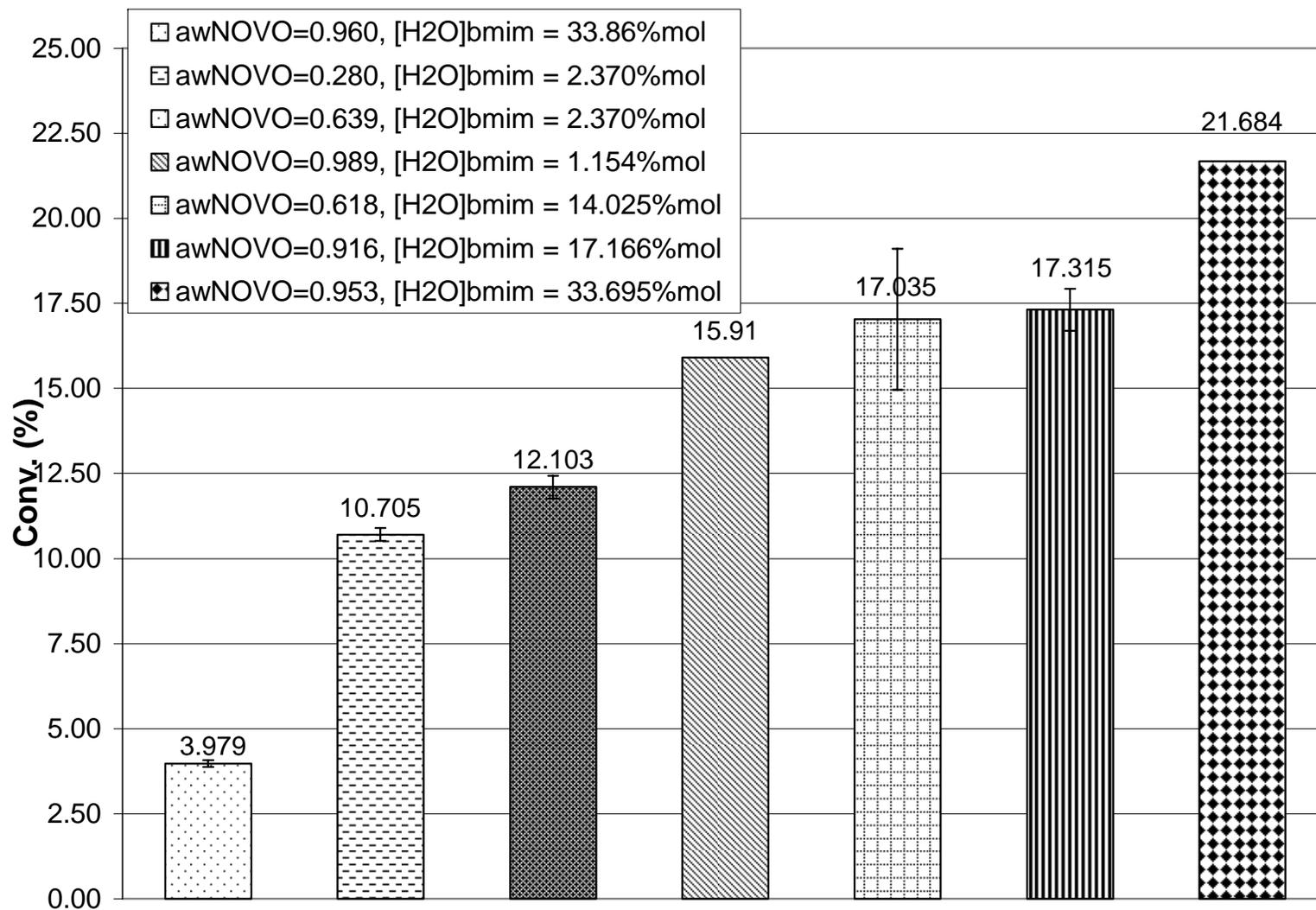


Figura 7. Conversión de Capsaicinoides

En la figura 17 se observa una tendencia clara. A mayor contenido de agua del líquido iónico, mayor conversión observada. Esto se puede deber a dos efectos. Ya que el agua es sustrato de la reacción, es posible que su concentración tenga un efecto positivo sobre la conversión. Por otro lado, el agua abate de forma exponencial la viscosidad del líquido iónico, de tal forma que la presencia de agua podría favorecer el mezclado y el contacto de sustratos con el catalizador.

1.3. Variación de viscosidad modificando contenido de agua y temperatura

La siguiente tabla presenta los resultados observados en reacciones que se llevaron a cabo para determinar el efecto de la temperatura y el contenido de agua sobre la conversión observada.

	a_{wNOVO}	$[H_2O]_{[bmim][PF_6]}$ (%mol/mol)	Temperatura (°C)	$\eta_{[bmim][PF_6]}$ (cP)	Conversión Promedio (%)
R7	0.015	7.29	25	272.4	1.485
R8	0.015	7.29	50	78.66	3.935
R9	0.964	25.11	25	94.01	3.520
R10	0.959	33.8	50	35.27	13.310

Tabla 2. Variación de la conversión en función de la viscosidad

Como se mencionó anteriormente, la viscosidad del líquido iónico decrece de forma exponencial en función del contenido de agua y también de la temperatura. En la tabla 3 se presenta la viscosidad medida del $[bmim][PF_6]$. Claramente se observa que a menor viscosidad del medio de reacción, mayor conversión por las razones expuestas.

1.4. Cálculos

Con el fin de corroborar que la reacción está limitada por la transferencia de materia, se llevaron a cabo una serie de cálculos simples con los cuales es posible inferir que, en efecto, existe dicha limitación. El cálculo consiste en el balance de materia con el cual se determina la cantidad de agua requerida para una hidrólisis de amidas de capsaicinoides del 100%.

- *Para calcular la cantidad teórica de agua requerida para hidrolizar el 100% de la mezcla de capsaicinoides:*

$$\frac{V \cdot C \cdot x \left[\frac{\text{wt}}{\text{wt}} \right]}{P.M. \cdot \text{Capsaicinoide}} \cdot \frac{1 \text{ mol}_{H_2O}}{1 \text{ mol}_{\text{Capsaicinoide}}} [=] \text{ mol}_{H_2O}$$

- *Para Capsaicina:*

$$\frac{0.01L \cdot 1 \frac{\text{g}}{L} \cdot 0.643}{305.41 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1 \text{ mol}_{H_2O}}{1 \text{ mol}_{\text{CAPSAICINA}}} = 2.1054 \times 10^{-5} \text{ mol}_{H_2O}$$

- *Para Dihidrocapsaicina:*

$$\frac{0.01L \cdot 1 \frac{\text{g}}{L} \cdot 0.336}{307.41 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1 \text{ mol}_{H_2O}}{1 \text{ mol}_{\text{DIHIDROCAPSAICINA}}} = 1.093 \times 10^{-5} \text{ mol}_{H_2O}$$

- Para Nordihidrocapsaicina:

$$\frac{0.01L \cdot 1 \frac{g}{L} \cdot 0.021}{293.41 \frac{g}{mol}} \cdot \frac{1 mol_{H_2O}}{1 mol_{NORDIHIDROCAPSAICINA}} = 7.1572 \times 10^{-7} mol_{H_2O}$$

- Se suman las tres cantidades y se convierten a peso de agua:

$$2.1054 \times 10^{-5} + 1.093 \times 10^{-5} + 7.1572 \times 10^{-7} = 3.27 \times 10^{-5} mol_{H_2O}$$

$$3.27 \times 10^{-5} mol_{H_2O} \cdot \frac{18000 mg_{H_2O}}{1 mol_{H_2O}} = 0.5886 mg_{H_2O}$$

Para la concentración inicial de mezcla de capsaicoides que se utilizó en todas las reacciones, serían necesarios $0.5886 mg_{H_2O}$. Utilizando los datos reportados en la Tabla 2 (página 34 de esta tesis), se conoce que cuando existe un contenido de agua de 2.37% ($\frac{mol}{mol}$) de agua, en 10mL de medio de reacción existen aproximadamente $20 mg_{H_2O}$ y utilizando el concepto de actividad acuosa, que en este caso es 0.1, existen aproximadamente 2mg de agua libres en el medio de reacción. A comparación del dato calculado anteriormente se observa que existe un exceso del 75% de agua en el medio de reacción. Con el fin de establecer si existe una limitante de transferencia de materia, se llevará a cabo la comparación entre las reacciones cuyas contenidos de agua fueron 17.17% $\frac{mol}{mol}$ y 33.69% $\frac{mol}{mol}$, y a los cuales correspondieron conversiones de capsaicina del 17.32% y 21.68% respectivamente. En la reacción con contenido inicial de agua del 17.17% $\frac{mol}{mol}$ existen aproximadamente 117mg de agua disponible. En la reacción con contenido inicial de agua del 33.69% $\frac{mol}{mol}$ existen alrededor de 417mg de agua disponible para reacción. En el primer caso, hay

casi 200 veces más agua de la requerida para alcanzar una conversión de amidas de capsaicinoides del 100%. En el segundo caso, el exceso es de 700 veces más agua de la requerida. Considerando que las reacciones catalizadas enzimáticamente siguen una cinética de saturación de la forma:

$$V([H_2O]) = \frac{V_{MAX} \cdot [H_2O]}{K_S + [H_2O]}$$

cuando $[H_2O] \gg K_S$, se puede despreciar el término K_S y en consecuencia, la rapidez de reacción se hace independiente de la concentración del sustrato. Considerando que a 17.17% $^{mol/mol}$ de agua ya ocurre que $[H_2O] \gg K_S$, no debería aumentar la rapidez de hidrólisis de capsaicinoides cuando se aumenta el contenido de agua. Sin embargo, se observa un incremento en la hidrólisis de capsaicina de alrededor del 5%. Esto implica que el efecto del contenido de agua no es cinético y, en consecuencia, debe estar relacionado con la disminución de la viscosidad del líquido iónico, o bien, en una mejora en las propiedades de transporte de materia del medio de reacción.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se observó que la hidrólisis enzimática de las amidas de los capsaicinoides ocurre en el líquido iónico [bmim][PF₆] como medio.

Se encontró que la hidrólisis enzimática de las amidas de los capsaicinoides presenta ventajas en comparación de los medios utilizados previamente. Las ventajas principales asociadas con el uso de líquidos iónicos son su ausencia de volatilidad y su alto grado de reuso.

Fue posible cuantificar la conversión de amidas de capsaicinoides a vainillilamina mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

Se observó que un mayor contenido de agua en el medio de reacción y una mayor actividad acuosa del biocatalizador promueven la conversión de la hidrólisis enzimática de las amidas de los capsaicinoides cuando se utiliza [bmim][PF₆] como medio.

Se observó que el incremento en temperatura también promueve los niveles de conversión de capsaicinoides a vainillilamina.

Se probó que el líquido iónico cuenta con propiedades de transferencia de materia limitadas por las cuales no se obtuvieron rendimientos comparables con los medios de reacción previamente utilizados para ésta reacción. En particular, la viscosidad del líquido iónico fue el factor limitante para el rendimiento. Se observó que a pesar del decremento en viscosidad del líquido observado con aumento de temperatura y/o de contenido de agua, éste decremento no es suficiente para eliminar los problemas de transferencia de materia asociados con viscosidad. Se propone utilizar un co-solvente inerte para la reacción que sea

capaz de eliminar los problemas de viscosidad del [bmim][PF₆]. Un candidato idóneo para éste propósito es el CO₂ en estado supercrítico ya que éste es muy soluble en el líquido iónico, cuenta con propiedades de transporte de materia favorables y cumple con los requisitos para llevar a un proceso extracción-reacción que opere en forma simultánea.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA

Astiasarán I, Martínez A. Alimentos, Composición y Propiedades. *McGraw-Hill Interamericana*, España, 1a edición (1999).

Ausich RL, Sanders DJ. Process for the Formation and Isolation and Purification of Comestible Xantophyll Crystals from Plants. *United States Patent No. 5648564* (1997).

Berberich JA, Kaar JL, Russell AJ. Use of Salt Hydrate Pairs to Control Water Activity for Enzyme Catalysis in Ionic Liquids. *Biotechnol. Prog.* (2003) 19, 1029-1032.

Blanchard LA, Gu Z, Brennecke JF. High-Pressure Phase Behavior of Ionic Liquid/CO₂ Systems. *J. Phys. Chem. B.* (2001) 105, 2437-2444.

Blanchard LA, Hancu D, Beckman EJ, Brennecke, JF. Green Processing Using ionic liquids and CO₂. *Nature* (1999) 399, 28-29.

Brennecke JF, Maginn EJ. Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing. *AIChE Journal* (2001) 47,11, 2384-2389.

Crowley R. Getting the Right Chemistry: A Look at Top Trends in Food Chemistry. *Food Safety Magazine* (2003).

De Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Understanding Structure-Stability Relationships of *Candida antarctica* Lipase B in Ionic Liquids. *Biomacromolecules* (2005) 6, 1457-1464.

Derera NF, Nagy N, Hoxha A. Condiment paprika research in Australia. *Journal of Business Chemistry* (2005) Vol. 2, Is. 1, 4-18.

Erbeldinger M, Mesiano AJ, Russell AJ. Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid – An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.* (2000) 1129-1131.

Gandhi NN. Review. Applications of Lipase. *Journal of the American Chemical Society* (1997) 74 (6), 621.

García HS, Ortega J, García ME, Martínez C. La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia* (1995) 46, 84-102.

Harris KR, Woolf LA. Temperature and Pressure Dependence of the Viscosity of the Ionic Liquid 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate. *J. Chem. Eng. Data* (2005) 50, 1777-1782.

Hoffman PG, Lego MC, Galetto WG. Separation and quantification of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* (1983) 31, 1326-1330.

Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry* (2001) 3, 156-164.

Ingle de la Mora G. Incremento al valor agregado de salmónidos a través de su pigmentación con colorantes naturales. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (2003).

IUPAC, Goldbook of Chemical Terminology, www.iupac.org/goldbook/.

Jarén-Galán M, Nienaber U, Schwartz SJ. Paprika (*Capsicum annuum*) Oleoresin Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47, 3558-3564.

Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ. Impact of Ionic Liquids Physical Properties on Lipase Activity and Stability. *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125, 4125-4131.

Lea AGH. In: MacRae R, *HPLC in Food Analysis*, Academic Press, London (1982).

Lozano P, De Diego T, Carrié D, Vaultier M, Iborra JL. Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150°C. *Biotechnol. Prog.*(2003) 19, 380-382.

Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M. Antioxidant Activity of Capsanthin and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* (1998) 46, 3468-3472.

Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reverse-Phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* (1993) 41, 1616-1620.

Minguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reverse-Phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* (1993) 41, 1616-1620.

Nara SJ, Harjani JR, Salunkhe M, Lipase catalyzed transesterification in ionic liquids and organic solvents: A comparative study. *Tetrahedron Lett.* (2002) 43, 2979-2982.

Reyes-Duarte MD, Castillo E, Bárzana E, López-Munguía A. Capsaicin hydrolysis by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology Letters* (2000) 22, 1811-1814.

Rodriguez-Amaya. Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods. John Snow, Inc./OMNI Project 1997.

Santamaría RI, Reyes-Duarte MD, Bárzana E, Fernando D, Gama FM, Mota M, López-Munguía A. Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annuum* L.) Using Ethanol as Solvent. *J. Agric. Food Chem.* (2000) 48, 3063-3067.

Seddon KR, Stark A, Torres MJ. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. *Pure Appl. Chem.* (2000) 72, 12, 2275-2287.

Sheldon RA, Madeira-Lau R, Sorgedraeger MJ, van Ranwijk F, Seddon KR. Biocatalysis in Ionic Liquids. *Green Chemistry* (2002) 4, 147-151.

Surh YJ, Lee RC, Park KK, Mayne ST, Liem A, Miller JA. Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and *N*-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis* (1995) 16, 2467-2471.

Van den Berg H, Faulks R, Fernando-Granado H, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. Review: The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* (2000) 80, 880-912.

Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* (1999) 99, 2071-2083.

Winter J, Bevan S, Campbell EA. Capsaicin and Pain Mechanisms. *Br. J. Anaesth.* (1995) 75, 157-168.