



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE DIÉSTERES DE LUTEINA EN  
FLUIDOS COMPRIMIDOS”

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN INGENIERÍA**  
INGENIERÍA QUÍMICA – PROCESOS

P R E S E N T A :

**I. BQ. PERLA JOCELYN CAMPILLO VELAZQUEZ**

TUTOR:  
**DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA**



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:	Dr. Alberto Tecante Coronel	Facultad de Química, UNAM
Secretario:	Dr. Miquel Gimeno Seco	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. Keiko Matsumoto Shirai	UAM – Iztapalapa
1er. Suplente:	Dr. Eduardo Vivaldo Lima	Facultad de Química, UNAM
2do. Suplente:	Dr. Jaime Vernon Carter	UAM – Iztapalapa

### **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 314, Edificio E.  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

---

Dr. Eduardo Bárzana G.

Asesor del tema

---

I.BQ. Perla Jocelyn Campillo Velázquez

Sustentante

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Química

Al Dr. Eduardo por abrirme las puertas al grupo de trabajo del L-314, por sus consejos y apoyo.

Al Dr. Miquel por sus sugerencias y apoyo

A Beto y Mina, por sus consejos y por las porras

A los compañeros del L-314 por la amistad y camaradería que me han brindado

Al CONACyT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

# INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
2.1 Carotenoides.....	6
2.1.1 Características generales.....	6
2.1.2 Clasificación de los carotenoides.....	9
2.1.3 Carotenoides en animales.....	10
2.1.4 Carotenoides en el ser humano.....	11
2.2 Luteína.....	12
2.2.1 Aplicaciones de la luteína.....	14
2.2.2 La luteína en la salud ocular.....	15
2.2.3 Obtención de luteína.....	16
2.3 Lipasas.....	17
2.3.1 Aplicaciones de las lipasas.....	19
2.3.2 Estructura de las lipasas.....	19
2.3.3 Inmovilización de enzimas.....	20
2.3.4 Lipasa de <i>Rhizomuchor miehei</i> .....	20
2.4 Enzimas en medios con bajo contenido de agua.....	22
2.5 El agua en la catálisis no acuosa.....	24
2.6 Fluidos comprimidos: uso de 1,1,1,2 tetrafluoroetano líquido.....	24

<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Hipótesis.....	27
3.2 Objetivo general.....	27
3.2.1 Objetivos específicos.....	27
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1. Materiales .....	28
4.1.1. Sustrato.....	28
4.1.2 Enzima.....	28
4.1.3 Reactivos y disolventes.....	28
4.1.4. Equipo.....	28
4. 2 Metodología.....	29
4.2.1 Ajuste de actividad de agua.....	29
4.2.2 Hidrólisis de diésteres de luteína en TFE.....	29
4.2.3 Inactivación de la enzima.....	30
4.2.4 Análisis de muestras.....	31
4.2.5 Diseño experimental.....	31
4.2.6 Análisis estadístico.....	31
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>32</b>
5.1 Pruebas preliminares de validación de actividad enzimática en TFE líquido.....	32
5.2 Arreglo de Taguchi.....	33

5.2.1 Cociente señal-ruido, S/N.....	34
5.2.2 Análisis de varianza.....	35
5.2.3 Gráfico de efectos.....	37
5.3 Pruebas de solubilidad.....	38
5.4 Diseño factorial $2^3$ .....	40
5.5 Evaluación de la concentración de enzima.....	43
5.6 Hidrólisis de diésteres de luteína en función del tiempo.....	44
5.7 Agua en la reacción.....	48
5.7.1 Agua presente en función de $a_{wi}$ .....	48
5.7.2 Consumo teórico de agua.....	48
5.7.3 Agua en el TFE.....	49
5.8 Cinética de la reacción.....	51
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO.....</b>	<b>57</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>61</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de carotenoides.....	6
Figura 2. Grupos laterales unidos al esqueleto carbonado básico en carotenoides.....	6
Figura 3. Espectro de absorción típico de pigmentos carotenoides.....	7
Figura 4. Isómeros del $\beta$ -caroteno.....	8
Figura 5. Carotenos y Xantofilas.....	9
Figura 6. Estructura de la Luteína.....	12
Figura 7. Dipalmitato de Luteína.....	14
Figura 8. Degeneración macular.....	15
Figura 9. Acción catalítica de las lipasas, hidrólisis y síntesis de triacilgliceroles.....	17
Figura 10. Estructura tridimensional de la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	21
Figura 11. Activación interfacial de la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	22
Figura 12. Diagrama esquemático del sistema de reacción.....	30
Figura 13. Hidrólisis de DL en TFE líquido.....	32
Figura 14. Gráfico de efectos.....	38
Figura 15. Reactor con mirillas.....	39
Figura 16. Vista lateral de reactor de mirillas.....	39
Figura 17. Reactor de mirillas, T=50°C.....	39
Figura 18. Reactor de mirillas, T= 65°C.....	39
Figura 19. Conversión en función de la temperatura, P= 25bar, t= 24 h, $a_{w_i}$ = 0.45, [DL]= 80 $\mu$ M.....	42
Figura 20. Conversión en función de la temperatura, P= 25 bar, t= 24h, $a_{w_i}$ = 0.70, [DL]= 80 $\mu$ M.....	42



Figura 21. Efecto de la concentración de enzima, T= 65 °C, P= 25bar, [E]= 0.625% W/V, [DL]= 80 μM.....	44
Figura 22. Hidrólisis de diésteres de luteína en función del tiempo, T= 65 °C, P= 25bar, [E]= 0.625% W/V, [DL]= 80 μM.....	45
Figura 23. Cromatograma de la hidrólisis de diésteres de luteína en TFE líquido.....	46
Figura 24. Perfiles de concentración de luteína, monoésteres y diésteres, P=25bar, T=65 °C, aw <sub>i</sub> =0.45, [DL]= 80μM.....	46
Figura 25. Perfiles de concentración de luteína, monoésteres y diésteres, P=25bar, T=65 °C, aw <sub>i</sub> =0.70, [DL]= 80μM.....	47
Figura 26. Representación del sistema de reacción a diferentes aw <sub>i</sub> .....	50
Figura 27. Curva de saturación de diésteres de luteína, P= 25 bar, T=65° C.....	51
Figura 28. Curva patrón de diésteres de luteína .....	61

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Xantofilas presentes en alimentos balanceados.....	11
Tabla 2. Contenido de luteína/zeaxantina en alimentos.....	13
Tabla 3. Lipasas microbianas disponibles comercialmente.....	18
Tabla 4. Aplicaciones industriales de lipasas.....	19
Tabla 5. Experimentos arreglo de Taguchi L9.....	34
Tabla 6. Resultados de experimentos.....	35
Tabla 7. Cálculo de S/N.....	36
Tabla 8. Análisis de varianza.....	38
Tabla 9. Experimentos diseño factorial $2^3$ .....	42
Tabla 10. Resultados diseño $2^3$ .....	42
Tabla 11. Efecto de $aw_i$ .....	45
Tabla 12. Agua presente en función de $aw_i$ .....	50
Tabla 13. Agua presente teórica consumida en función de $aw_i$ .....	51
Tabla 14. Constantes cinéticas aparentes. T= 65 °C, P= 25bar, [E]= 0.625% W/V.....	54
Tabla 15. Constante de especificidad. T= 65° C, P= 25bar, [E]= 0.625% W/V.....	55

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AMD	Degeneración macular asociada a la edad, por sus siglas en inglés.
ANOVA	Análisis de Varianza, por sus siglas en inglés.
Asp	Aspartato.
$a_{wi}$	Actividad de agua inicial.
bar	Bares
DL	Diésteres de luteína.
[DL]	Concentración de diésteres de luteína inicial.
FDA	Food and Drug Administration.
FSC	Fluidos súper críticos.
G	Gramos.
GRAS	Generally Recognized As Safe.
G.L.	Grados de libertad.
H	Horas.
H	Número de Hill.
His	Histidina.
KDa	Kilo Daltones.
$K_M$	Constante de Michaelis.
$K_{Mapp}$	Constante de Michaelis aparente.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
MP	Pigmento macular.
MSD	Desviación media cuadrada, por sus siglas en inglés.
muA	Miliunidades de Absorbancia.
nm	nanómetros.
s	Segundos.

[S]	Concentración de sustrato.
[S <sub>0.5</sub> ]	Concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima.
scCO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico.
SDC <sub>i</sub>	Suma de cuadrados de las diferencias.
Ser	Serina.
S/N	Relación señal-ruido.
TFE	1,1,1,2 tetrafluoroetano.
v/v	Volumen sobre volumen.
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial.
V <sub>i</sub>	Varianza de la fuente.
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima.
V <sub>max<sub>app</sub></sub>	Velocidad máxima aparente.
w/v	Peso sobre volumen.
°C	Grados centígrados.
Mg	Microgramos.
μM	Micromolar.
ρ <sub>i</sub>	Porcentaje de contribución de la fuente a la variación total.

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se evaluó el uso de TFE (1,1,1,2 tetrafluoroetano) en estado líquido, que es un fluido GRAS (Generally Recognized As Safe) con propiedades físicoquímicas adecuadas, como disolvente en la reacción de hidrólisis enzimática de diésteres de luteína provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*); para tal propósito se empleó la forma comercial e inmovilizada de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM.

Empleando un diseño experimental de Taguchi (arreglo L9) se evaluó el efecto de la temperatura, la presión, la actividad inicial de agua del biocatalizador ( $a_{wi}$ ) y la concentración de enzima sobre la conversión de diésteres de luteína. Se encontró que 25 bar es la presión óptima de operación y que hubo un aumento de conversión al aumentar la temperatura y la concentración de enzima. Por otro lado los resultados obtenidos no fueron concluyentes para el efecto de  $a_{wi}$ .

Se evaluó el aumento de la concentración de enzima; para una concentración inicial de sustrato de 80  $\mu$ M el aumento de concentración de enzima de 0.625%w/v a 1%w/v produjo un incremento del 9% en la conversión.

Una vez encontradas las condiciones de presión y de concentración de enzima óptimas se realizó el seguimiento de la reacción en el tiempo. Se observó que a 70° C y 1.5 días de reacción, el sustrato y los productos son inestables perdiendo coloración, por lo que se fijó la temperatura de trabajo en 65° C.

Para conocer el  $a_{wi}$  óptimo se realizaron curvas de saturación de sustrato en función de esta variable. Finalmente se cuantificó la cantidad de agua presente en el biocatalizador preajustado a dos valores de  $a_{wi}$  y en base a la estequiometría

de la reacción se determinó el agua requerida para la hidrólisis del sustrato. Se observó que el aumento de  $a_{wi}$  incrementó la rapidez de reacción.

Se encontró que la temperatura y presión óptimas corresponden a 65° C y 25 bar, respectivamente; mientras que la concentración inicial óptima de enzima corresponde a 0.625%w/v para una concentración inicial de sustrato de 80  $\mu$ M. Por otra parte fijando las variables antes mencionadas en sus valores óptimos y  $a_{wi}$ = 0.70, se observó una conversión de 80%.

## **ABSTRACT**

This work evaluates the use of environmentally friendly liquid TFE (1,1,1,2 tetrafluoroethane) as GRAS (Generally Recognized As Safe) solvent which has physical and chemical properties adequate for the enzymatic hydrolysis of lutein diesters from Marigold flower (*Tagetes erecta*). For this purpose we used the commercially immobilized lipase from *Mucor miehei* Lipozyme RM IM.

In this work we employed Taguchi experimental design (L9 array) to evaluate the effect of temperature, pressure, enzyme concentration and initial biocatalyst water activity ( $a_{wi}$ ) for the hydrolysis of lutein diesters. It was found that 25 bar is the optimal operating pressure, while an increase in temperature and enzyme concentration improved the conversion. On the other hand, results were not conclusive regarding the effect of  $a_{wi}$ .

The increase enzyme in concentration was evaluated. For an initial substrate concentration of 80  $\mu$ M, the increase of enzyme from 0.625% w / v to 1%w/v raised the conversion 9%. Once found optimum values of pressure and enzyme concentration, reaction was monitored at different times. It was found that at 70 ° C and 1.5 days substrate and products are unstable. Therefore temperature of reaction was kept at 65° C in all the experiments.

Substrate saturation curves were analyzed to find the optimal  $a_{wi}$ . Finally, water adsorbed onto biocatalyst particles at particular  $a_{wi}$  was determined.

The optimal temperature and pressure were 65 ° C and 25 bar, respectively, while the optimal enzyme concentration was 0,625% w/v (when initial

substrate concentration was 80  $\mu\text{M}$ ). By setting the operating variables at their optimal values, and  $a_{wi} = 0.70$ , a conversion of 80% was reached.



## 1. INTRODUCCION

La luteína es un carotenoide oxigenado presente de manera importante en frutas y vegetales, así como en la yema de huevo. En el ser humano es uno de los principales componentes del MP (pigmento macular), una pequeña área de la retina visiblemente discernible como una mancha amarilla (*macula lutea*) que es responsable de la visión central. El MP filtra la luz azul (altamente energética) que llega a la retina, teniendo con esto un efecto fotoprotector. La AMD (degeneración macular relacionada con la edad) es una de las principales causas de ceguera en adultos mayores. Esta enfermedad involucra la degradación de la retina. Existe evidencia importante que sugiere que el consumo de luteína incrementa la concentración de MP, lo que está asociado con la disminución del riesgo de padecer AMD; de aquí que exista una creciente demanda de este carotenoide en el mercado de los suplementos alimenticios.

Aunque la luteína está presente en vegetales y frutas, es sin duda la flor de cempasúchil la fuente de luteína más importante desde el punto de vista industrial (Zorn et al.,2003). El proceso de extracción de este carotenoide involucra el empleo de disolventes orgánicos, así como de soluciones altamente corrosivas, lo que trae consecuencias adversas al medio ambiente y podría resultar en restricciones del empleo de luteína para consumo humano. Se ha estudiado con anterioridad la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína de flor de cempasúchil usando no solo disolventes orgánicos sino también CO<sub>2</sub> en estado supercrítico como medio de reacción (González Mejía, 2006; Montenegro Pereira, 2007; Mora-Pale 2007, Pérez-Munguía et al. 2007; Mora Pale, 2007). Asimismo, se han reportado la estabilidad y el poder catalítico de ciertas lipasas en TFE en estado líquido (García-Arazola, 2007; Gimeno et al., 2007; Yu et al., 2007; Castillo Ruz, 2010; López-Luna et al., 2010). Con base en el marco teórico descrito en este trabajo se realizó el estudio de la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína empleando la lipasa de *Rhizomuchor miehei* y TFE líquido como medio de reacción, con el propósito de conocer el comportamiento del sistema frente al cambio de variables de operación y comparar con los resultados previamente reportados.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Carotenoides

#### 2.1.1 Características generales

Los carotenoides son una clase de pigmentos distribuidos ampliamente en la naturaleza. Forman un grupo de más de 600 compuestos que juegan un papel importante en las reacciones fotoquímicas que van desde la fotosíntesis hasta la visión (Kohler, 1995). Como se observa en la Figura 1, la estructura básica de los carotenoides consiste en ocho unidades isoprenoides.

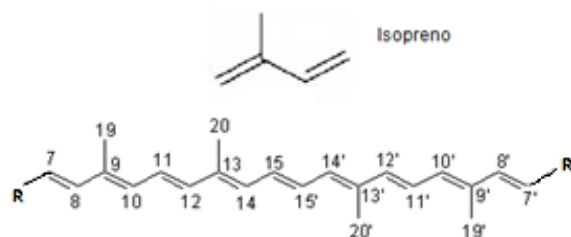


Figura 1. Estructura básica de carotenoides.

El esqueleto carbonado básico de los carotenoides puede encontrarse unido a diferentes grupos laterales, como los que se indican a continuación (Figura 2).

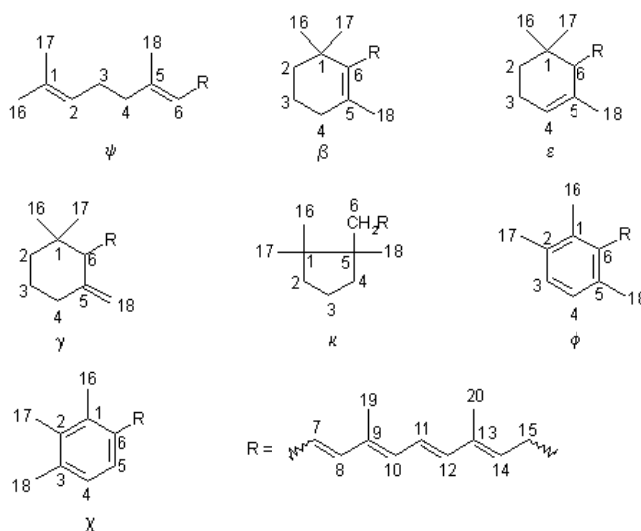


Figura 2. Grupos laterales unidos al esqueleto carbonado básico en carotenoides.

Los carotenoides presentan pigmentaciones que van desde las distintas tonalidades de amarillo, naranja y rojo. Son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos e insolubles en agua, razón por la cual que son extraídos de tejidos vegetales utilizando disolventes orgánicos, tales como acetona, cloroformo o hexano, entre otros.

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados presentes en su estructura, los carotenoides exhiben bandas de absorción espectral definidas en la zona del visible (Figura 3). Estos pigmentos son inestables en presencia de oxígeno atmosférico, perdiendo su color debido a la auto oxidación (Fox, 1953). De aquí que su extracción se realice con las precauciones pertinentes, para la protección de la luz solar y en atmósferas libres de oxígeno.

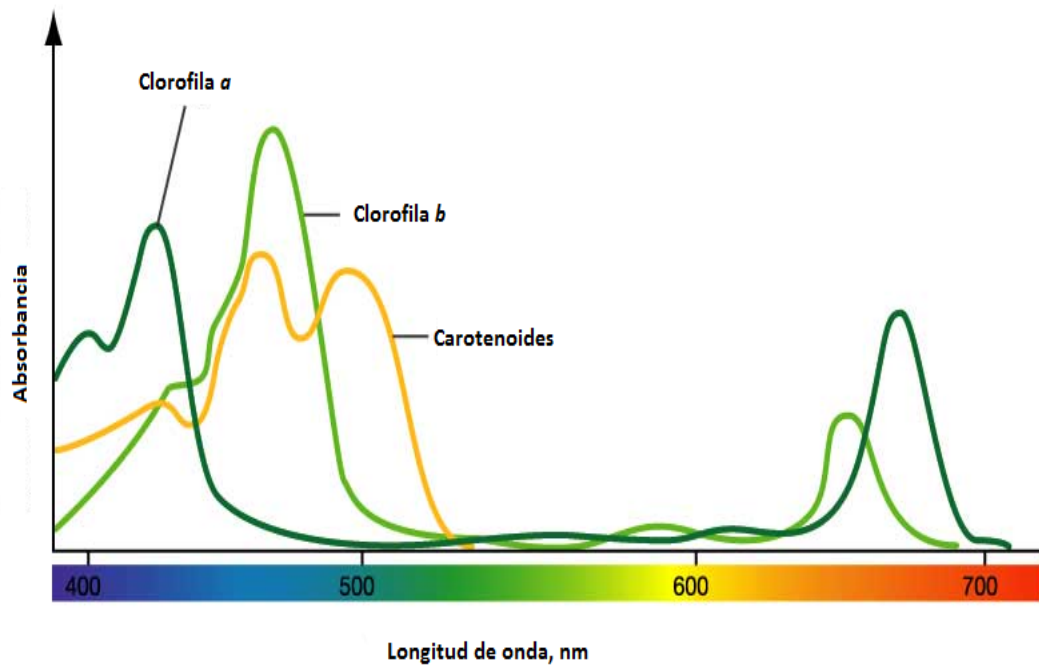


Figura 3. Espectro de absorción típico de pigmentos carotenoides.

La isomerización geométrica (*cis-trans*) es una propiedad fotoquímica característica de los carotenoides (Kohler, 1995), en la Figura 4 se observan algunos isómeros geométricos del  $\beta$ -caroteno; sin embargo, la mayoría de carotenoides aislados en la naturaleza se presentan en la forma todos *trans*, debido a que es la forma isomérica más estable (Naranjo Modad, 2000).

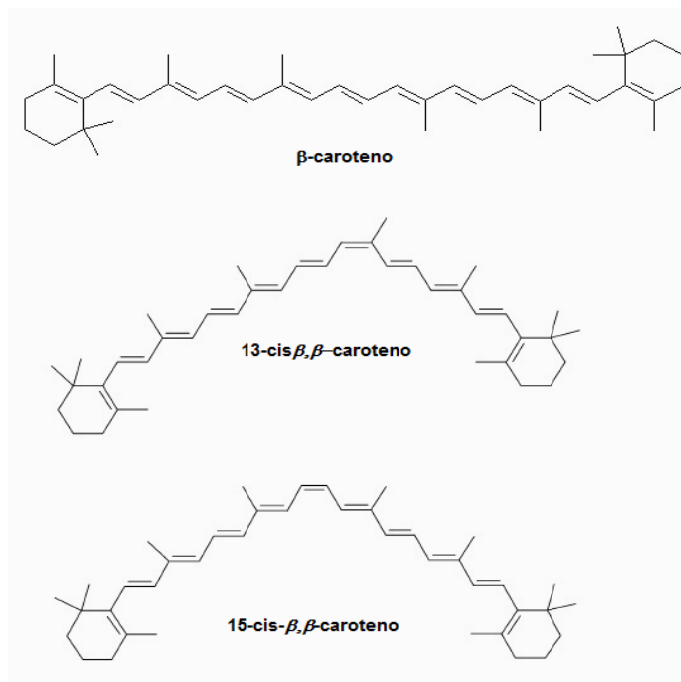


Figura 4. Isómeros del  $\beta$ -caroteno.

Los pigmentos carotenoides son sintetizados por plantas superiores, por algunas especies de levaduras o hongos, algas y bacterias, mientras que en animales deben ser obtenidos de la dieta (Breithaupt, 2007).

En plantas, los carotenoides cumplen importantes funciones, entre ellas impedir la formación de especies de oxígeno altamente reactivas. Los carotenoides son acumulados en los cloroplastos, siendo responsables de los colores amarillo, rojo y naranja de frutas y pétalos.

## 2.1.2 Clasificación de los carotenoides

De forma general los carotenoides son clasificados en dos grupos: carotenos que carecen de oxígeno en su estructura como el  $\beta$ -caroteno y el licopeno (Figura 5). Por otra parte los oxicarotenoides o xantofilas son carotenoides que contienen oxígeno en su estructura, el cual puede encontrarse en forma de alcohol, cetona, aldehído, éter y éster, lo que les hace ligeramente más polares que los carotenos (Figura 5). La luteína y la astaxantina constituyen ejemplos de xantofilas que contienen en su estructura grupos alcohol o cetona (Fox, 1953).

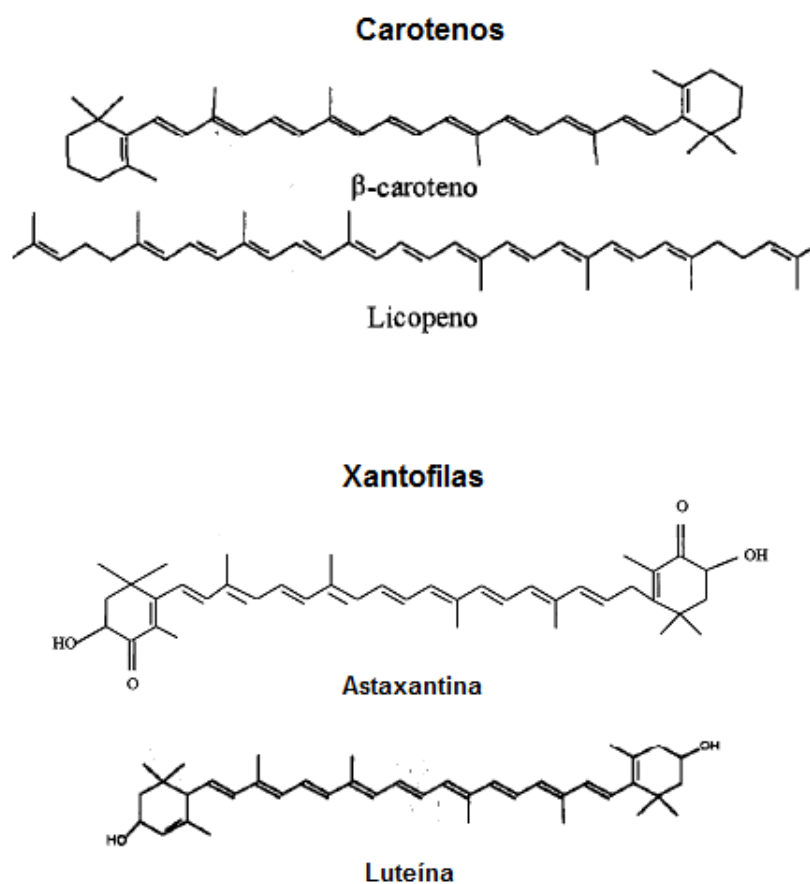


Figura 5. Carotenos y Xantofilas

### 2.1.3 Carotenoides en animales

Como se mencionó con anterioridad, los animales no pueden sintetizar carotenoides de novo, por lo que éstos deben ser obtenidos de la dieta. Mientras que la presencia de carotenoides en mamíferos es limitada, éstos pigmentos se encuentran ampliamente distribuidos en aves, peces y animales invertebrados, pudiéndose encontrar en su forma libre, como ésteres o unidos con lipoproteínas (Schweigert, 1995).

En peces, las xantofilas están presentes en la carne, huevos y piel de especies como el salmón y la trucha, encontrándose también en el caparazón de crustáceos (camarón y langosta), y en la grasa subcutánea, piel, yema y plumas de aves (Breithaupt, 2007), cumpliendo funciones de coloración importantes para el camuflaje y fines reproductivos. Por otro lado, los patrones de color en especies animales están relacionados con individuos saludables y con características genéticas que aseguran la supervivencia y propagación de las especies (Britton, 1983).

Desde el punto de vista industrial, las xantofilas son una clase de pigmentos ampliamente usados en la formulación de alimentos, y de manera particular en las industrias avícolas y acuícolas, puesto que el color en alimentos influye directamente con la elección por los consumidores. El uso de estos pigmentos garantiza productos con mayor atractivo visual, aunado a los beneficios a la salud que acarrea el consumo de carotenoides. En la Tabla 1 se presenta una lista de xantofilas y sus usos en las industrias avícola y acuícola.

Tabla 1. Xantofilas presentes en alimentos balanceados. Adaptación (Breithaupt, 2007).

<b>Aditivo</b>	<b>Formulación de alimento</b>
Capsantina	Ave de engorda
$\beta$ -Apo-8'-Carotenal	Ave de engorda
$\beta$ -Apo-8' acido caroténico etil ester	Ave de engorda
Luteína	Ave de engorda
Cryptoxantina	Ave de engorda
Cantaxantina	Ave de corral, gallinas ponedoras, salmón, trucha.
Zeaxantina	Ave de engorda
Citranaxantina	Gallinas ponedoras
Astaxantina	Salmón, Trucha.

#### 2.1.4 Carotenoides en el ser humano

Aunque se han identificado cientos de carotenoides en la naturaleza, solo unos cuantos son encontrados en sangre y tejido humano; y tan solo dos pigmentos carotenoides, luteína y zeaxantina, se han identificado en el ojo. Los carotenoides más estudiados son el  $\beta$ -caroteno, el licopeno, la luteína y la zeaxantina.

Al igual que el resto de los animales, los humanos no producimos carotenoides, por lo que debemos ingerirlos en la dieta. Las principales fuentes vegetales son zanahorias ( $\beta$ -caroteno), tomates y melones (licopeno), vegetales de hojas verdes (luteína), naranjas, papayas y mangos ( $\beta$ -cryptoxantina).

Los carotenoides pueden también ser obtenidos de alimentos de origen animal. Los productos lácteos tales como el queso y la mantequilla, son ricos en  $\beta$ -caroteno, la yema de huevo es rica en luteína, y los alimentos marinos tales como langosta, camarón y salmón son abundantes en astaxantina (Schweigert, 1995; Baker y Günther, 2004).

Estudios previos señalan que el consumo de carotenoides trae importantes beneficios a la salud humana (Giovannucci et al., 1995; Johnson 2002; Alves-

Rodrigues y Shao, 2004), ya que han sido señalados como potentes antioxidantes importantes en la prevención del daño celular inducido por radicales libres (Burton, 1989). Su consumo ha sido relacionado con la prevención de ciertos tipos de cáncer y enfermedades oculares (Johnson, 2002). De aquí que exista un aumento en el consumo global de estos compuestos no solo mediante la ingesta de alimento que los contienen, sino también en suplementos alimenticios (Breithaupt, 2007).

## 2.2 Luteína

La luteína, cuya estructura química se muestra en la Figura 6, es un carotenoide oxigenado, o xantofila, que recientemente ha captado la atención de investigadores, por su papel importante en la salud de la mácula ocular.



Figura 6. Estructura de la Luteína

La luteína está presente de manera importante en frutas y vegetales, siendo la espinaca una fuente muy rica en éste carotenoide. En la yema de huevo, al igual que en vegetales verdes se encuentra en su forma libre (Hojnik et al., 2008). A continuación se presenta el contenido de luteína en algunos alimentos.



Tabla 2. Contenido de luteína/zeaxantina en alimentos. Adaptación (Johnson, 2002)

<b>Alimento</b>	<b>Contenido (mg/100 g peso húmedo)</b>
Brócoli, cocido	2.2
Coles de Bruselas, cocidas	1.3
Maíz dulce, cocido	1.8
Yema de huevo	0.3
Col, cocida	15.8
Lechuga, cruda	2.6
Chícharos, cocidos	1.4
Espinaca, cocida	7.1
Espinaca, cruda	11.9

Aunque la luteína está presente en distintos alimentos, desde el punto de vista industrial la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) representa una importante fuente. Esta planta pertenece a la familia de las Compuestas (Asteraceae) y es nativa de México y América Central (Hojnik et al., 2008).

En la flor de cempasúchil, las xantofilas están presentes de forma abundante, representando del 0.6 al 2.5% en peso seco de la flor y del 88 al 92% de las xantofilas totales son luteína y zeaxantina, aunque la presencia de luteína es predominante (Tsao et al., 2004).

La luteína presente en la flor de cempasúchil se encuentra esterificada con ácidos grasos de entre 12 y 18 carbonos. Philip y Berry (1975) reportaron que del 83 al 92% de los esteres totales presentes en la flor de cempasúchil corresponden a dimiristato y dipalmitato de luteína, cuya estructura se muestra en la Figura 7 (Philip y Berry, 1976).

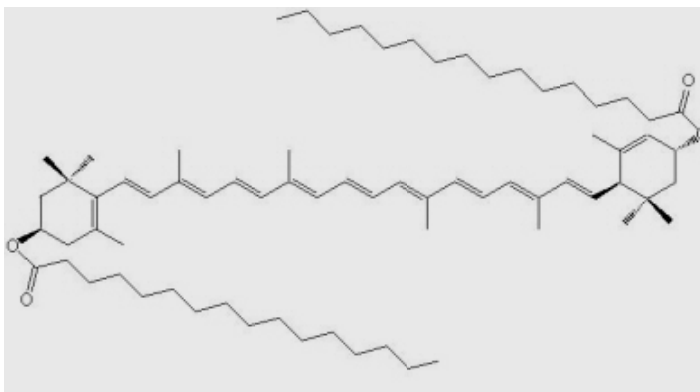


Figura 7. Dipalmitato de Luteína

### 2.2.1 Aplicaciones de la luteína

Las aves de corral acumulan xantofilas eficientemente, lo que se traduce en una buena coloración de la piel y yema de huevo. La intensidad y la coloración en piel y yema son controladas por la concentración y tipo de xantofilas suministradas en la dieta de las aves. De aquí que hasta hace unos años la aplicación más importante de la luteína era en la formulación de alimentos para aves de corral.

En años recientes, el uso de luteína en la formulación de suplementos alimenticios para consumo humano ha aumentado de forma impresionante, convirtiéndose en la principal aplicación de este pigmento desde el punto de vista económico (Frost y Sullivan, 2007).

Una gran cantidad de estudios señalan que el consumo de luteína trae importantes beneficios a la salud, entre los que se encuentran la disminución del riesgo de sufrir enfermedades coronarias o la disminución del riesgo de desencadenar algunos tipos de cáncer (Alves-Rodrigues y Shao, 2004). Pero es sin duda la relación que se ha encontrado entre el consumo de luteína con la disminución de enfermedades oculares degenerativas lo que ha promovido la incursión de este carotenoide en el mercado de los suplementos alimenticios para consumo humano.

### 2.2.2 La luteína en la salud ocular

Como se mencionó anteriormente, solo la luteína y su estéreo isómero zeaxantina son encontrados en el ojo y han sido identificados como los principales constituyentes del MP en la retina humana (Landrum y Bone, 2001; Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

El MP de la retina humana se presenta como una mancha amarilla (*macula lutea*) en la retina central y su función más importante es absorber y atenuar la luz azul que llega a la retina, teniendo un efecto fotoprotectivo de la retina humana (Landrum y Bone, 2001; Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

La AMD es la principal causa de ceguera en personas mayores de 65 años, siendo consecuencia de la degradación de la mácula, porción de la retina encargada de la visión central (Figura 8).

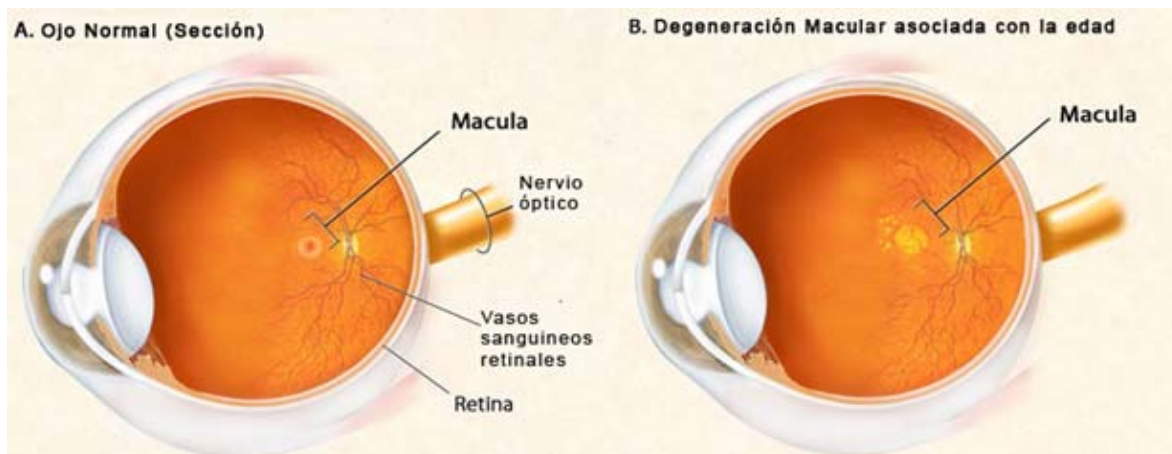


Figura 8. Degeneración macular

Se sabe que el aumento del MP reduce de manera dramática el riesgo de padecer esta enfermedad. Por ende, la luteína y la zeaxantina presentes en la dieta, ya sea por consumo de alimentos ricos en estos carotenoides o por su consumo en suplementos alimenticios, están directamente relacionadas con la concentración MP en la retina humana (Aman et al., 2005). De esta forma, el consumo regular de luteína reduce de manera importante el riesgo de padecer ADM (Landrum y Bone, 2001).

### 2.2.3 Obtención de luteína

La obtención de luteína a nivel industrial es llevada a cabo principalmente a partir de la flor de cempasúchil. El proceso comercial comprende en primer lugar el molido y secado de la flor, de donde se obtiene una harina, la cual es sometida a un proceso de extracción con hexano, que es posteriormente recuperado por evaporación. Como la luteína no esterificada es absorbida de forma más eficiente en el organismo, la oleoresina rica en diésteres de luteína es saponificada para obtener luteína libre, etapa que se lleva a cabo empleando soluciones alcalinas a temperaturas alrededor de 80 °C para obtener la hidrólisis completa (Zorn et al., 2003). Dependiendo del uso final de la luteína se procede a realizar la formulación del producto obtenido en caso de ser destinada para consumo animal o se procede a una purificación exhaustiva en caso de ser destinada para consumo humano (González Mejía 2006; Montenegro Pereira 2007; Mora-Pale et al., 2007; Mora Pale 2007).

El proceso tradicional de obtención de luteína presenta desventajas desde el punto de vista ambiental, puesto que el hexano empleado debe ser evaporado para su recuperación (además de fugas indeseables a la atmósfera), lo que implica un gasto energético importante. Por otra parte, la saponificación implica el establecimiento de medidas de seguridad, ya que se trabaja con soluciones altamente corrosivas y con temperaturas de 80 °C. La posible presencia de trazas contaminantes en los productos finales impone restricciones obvias cuando la luteína extraída es destinada para consumo humano. Por ello se hace necesaria la investigación para la implementación de nuevos procesos amigables con el medio ambiente, que se traduzcan en beneficios para el fabricante y garanticen la inocuidad y pureza para el consumidor final del producto.

Con esta visión, Mora y colaboradores (2007) propusieron la sustitución de la etapa de saponificación por un proceso más suave como lo es la hidrólisis enzimática de los diésteres. Además, al llevarla a cabo durante la etapa de extracción con hexano se evita la etapa de saponificación con lo que se esperaba

la reducción de los costos operativos del proceso (Mora-Pale et al., 2007; Mora Pale 2007).

Naranjo Modad (2000) reportó la extracción de diésteres de luteína de la flor de cempasúchil empleando  $\text{scCO}_2$ .

Una alternativa novedosa para reforzar la propuesta de un proceso ecológico fue el empleo de fluidos comprimidos como medio de reacción. Mora y colaboradores (2007) evaluaron el uso de dióxido de carbono supercrítico,  $\text{scCO}_2$  como medio de reacción, encontraron que a  $55\text{ }^\circ\text{C}$  y 350 bar se alcanza una conversión del 70% (un día de reacción).

Con el objetivo de proponer alternativas más económicas y ecológicas en el presente trabajo se evaluó el empleo de TFE, un refrigerante amigable con el medio ambiente y clasificado como GRAS por la FDA (Food and Drug Administration), con propiedades físicas prometedoras para uso como disolvente, como medio novedoso de reacción.

### 2.3 Lipasas

Las lipasas o triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3) son esterasas de gran importancia fisiológica e industrial que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos para formar diacilglicéridos, monoacilglicéridos, glicerol y ácidos grasos libres en la interface entre fases acuosas y disolventes orgánicos (Figura 9). Sin embargo, son también capaces de catalizar las reacciones reversas de síntesis, lo que ha ampliado de manera dramática su empleo en procesos industriales (Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998).

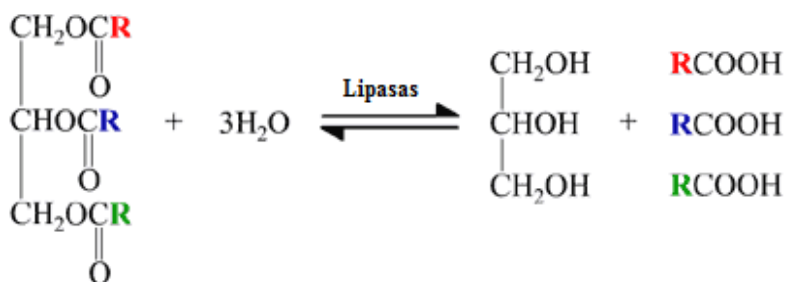


Figura 9. Acción catalítica de las lipasas, hidrólisis y síntesis de triacilgliceroles.

Un aspecto importante que hace posible el uso de las lipasas en una gran variedad de aplicaciones es que, a diferencia de la mayoría de las enzimas, las lipasas presentan una amplia especificidad de sustratos (triacilgliceroles, ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos y aromáticos), reaccionan con gran selectividad (enantio y regio) frente a ésteres racémicos o sustratos con varios grupos hidroxilo. Aunado a lo anterior, las lipasas no sólo son estables en disolventes orgánicos, sino que dependiendo del disolvente empleado realizan reacciones de hidrólisis o de síntesis (Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998; Sharma et al., 2001). Las lipasas están presentes tanto en microorganismos como en animales y plantas, siendo indispensables en el metabolismo de los lípidos. Aunque estas enzimas se encuentran presentes de manera abundante en la naturaleza, son sin duda las lipasas de origen microbiano las más empleadas comercialmente (Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998).

Tabla 3. Lipasas microbianas disponibles comercialmente. Adaptación (Jeager y Reerz, 1998).

<b>Organismo fuente</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Compañía</b>
<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer
<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntesis orgánica	Novo Nordisk, Mannheim, Fluka, Genzyme
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo detergente	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos/síntesis orgánica	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo detergente	Genencor
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo detergente	Genencor
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

### 2.3.1 Aplicaciones de las lipasas

Las lipasas son enzimas ampliamente empleadas en una gran variedad de procesos industriales que van desde la formulación de detergentes y agentes desengrasantes, hasta la industria de los cosméticos. En la Tabla 4 se mencionan algunas industrias donde se emplean lipasas de manera predominante (Sharma et al., 2001).

Tabla 4. Aplicaciones industriales de lipasas. Adaptación (Sharma et al., 2001)

<b>Industria</b>	<b>Aplicación</b>
Detergentes	Remoción de grasa
Productos lácteos	Desarrollo de sabores en leche, queso y mantequilla.
Bebidas	Mejoramiento de aromas
Industria Química	Enantioselectividad y síntesis
Industria Farmacéutica	Producción de lípidos especiales, y en la formulación de productos de ayuda digestiva.
Papel	Remoción de componentes hidrofóbicos de la madera.

### 2.3.2 Estructura de las lipasas

Aunque las lipasas provienen de distintas fuentes y exhiben un rango de pesos moleculares diverso, comparten un patrón característico en su estructura tridimensional conocido como el “plegado  $\alpha/\beta$ -hidrolasa”, el cual consiste en un núcleo compuesto de ocho hojas  $\beta$  conectado por seis hélices  $\alpha$ . Estudios cristalográficos señalan que las lipasas presentan en su estructura un bucle peptídico o “tapa”, que cubre el sitio activo, que al estar en contacto con una interfase lípido/agua, sufre cambios conformacionales dejando al sitio activo accesible al sustrato, efecto que se conoce como activación interfacial (Brady et al., 1990; Brzozowski et al., 1991; Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998). Aunque este fenómeno es común para la mayoría de las lipasas, existen lipasas que no lo presentan, como en los casos de la lipasa B de *Candida antarctica* y de la lipasa de *Pseudomonas glumae*. Para ambas la “tapa” que cubre el sitio activo

está presente pero no presentan interacción interfacial (Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998).

El sitio activo de las lipasas está formado por una triada catalítica compuesta por residuos de serina, histidina y aspartato o glutamato, conectados a través de puentes de hidrógeno. La hidrólisis del sustrato inicia con el ataque nucleofílico del oxígeno de serina al carbono carbonílico del enlace éster formándose un intermediario estabilizado por puentes de hidrógeno. Tras la formación de un alcohol se forma el complejo acil-enzima, que finalmente se hidroliza con la liberación del ácido graso y la regeneración de la enzima (Brady et al., 1990; Jeager y Reerz, 1998; Schmid y Verger, 1998).

### 2.3.3 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas persigue restringir el movimiento de estas moléculas en el espacio, mediante el uso de soportes físicos. Esto generalmente resulta en una forma de enzima insoluble en medios de reacción, lo que facilita la recuperación de la enzima al final del proceso y su reuso. Existen distintos métodos de inmovilización que van desde el atrapamiento de la enzima en matrices porosas hasta la unión de la enzima al soporte por adsorción o unión covalente pasando por la combinación de éstos métodos. Por otro lado los materiales usados como soporte pueden ser hidrofóbicos, tales como poliestireno y polietileno, o hidrofílicos, entre los que se encuentran la sílica gel, sefarosa y celita por citar algunos (Wang et al., 1979).

### 2.3.4 Lipasa de *Rhizomucor miehei*

La lipasa de *Rhizomucor miehei* es una proteína conformada por 269 residuos de aminoácidos (Figura 10), con un peso molecular de 29.472 kDa. Su estructura tridimensional es característica de las lipasas que presentan plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Brady et al., 1990; Brzozowski et al., 1991).



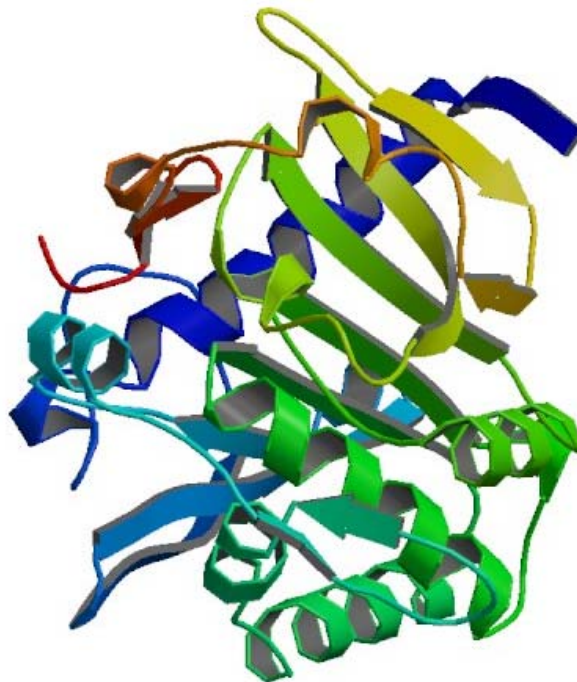


Figura 10. Estructura tridimensional de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990).

El sitio activo de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, conformado por los residuos Ser144, His 257 y Asp203, presenta activación interfacial, que se esquematiza en la Figura 11 (Brady et al., 1990; Brzozowski et al., 1991).

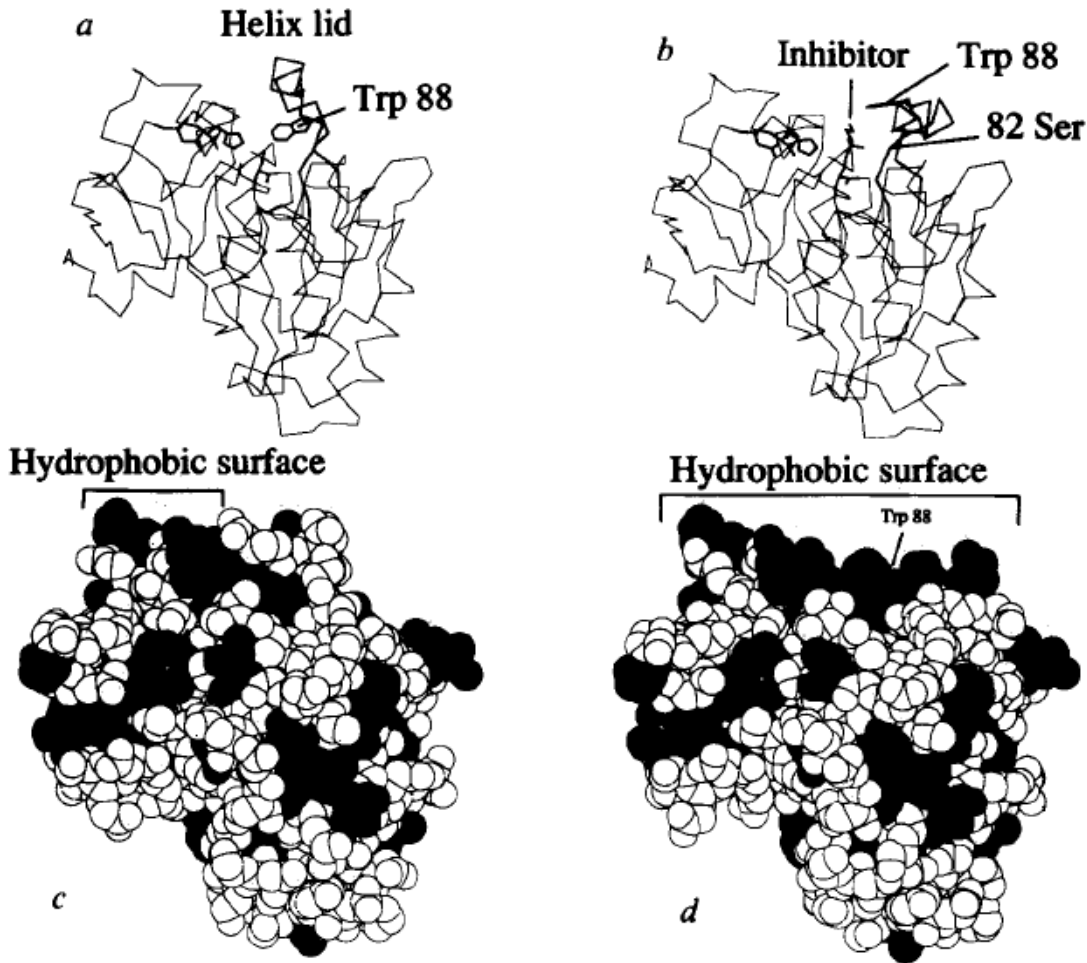


Figura 11. Activación interfacial de la lipasa de *Rhizomucor miehei*. a) Enzima nativa, b) Complejo enzima-inhibidor, c) Estructura atómica completa de la enzima nativa, b) del complejo enzima-inhibidor (Brzozowski et al., 1991).

En el presente trabajo se empleó la lipasa de *Rhizomucor miehei*, comercializada bajo el nombre de Lipozyme RM 1M (Novozymes), esta lipasa se encuentra soportada en una resina macroporosa de intercambio aniónico de tipo fenólico y con un tamaño de partícula de 200-600  $\mu\text{m}$ .

#### 2.4 Enzimas en medios con bajo contenido de agua

Inicialmente el empleo de enzimas en la industria era reducido puesto que se pensaba que éstas eran activas sólo en ambientes acuosos, lo que limitaba su

uso ya que un gran número de compuestos son insolubles en agua (Dordick, 1989; Klibanov, 2003; Zorn et al., 2003). Los estudios de enzimas en mezclas agua-disolventes orgánicos datan de principios del siglo XX. Sin embargo, fue hasta la década de los ochenta cuando quedó demostrada la actividad enzimática de las hidrolasas en disolventes orgánicos hidrofóbicos, ampliando con ello el panorama para la catálisis enzimática (Klibanov, 1997; Zaks y Klibanov, 1998; Krishna, 2002).

En la actualidad es bien sabido que la naturaleza del disolvente orgánico tiene un efecto importante sobre la actividad enzimática. Los disolventes altamente polares pueden solubilizar cantidades importantes de agua, pudiendo secuestrar de la enzima el agua esencial necesaria para formar las interacciones no covalentes que le permiten mantener su conformación activa (Dordick, 1989; Klibanov, 1997; Zaks y Klibanov, 1998).

Uno de los parámetros más importantes en la catálisis convencional es sin duda el pH pero en la catálisis en medios no acuosos el pH no tiene significancia. Sin embargo, un fenómeno presentado por las enzimas en medios no acuosos es la memoria de pH, esto es, la actividad catalítica mostrada por las enzimas está relacionada con el pH de la última solución acuosa a la que la enzima fue expuesta, manteniendo los grupos ionizables de la enzima su estado de ionización al ser puestos en medios no acuosos. Por ende, es una práctica común en la catálisis no acuosa exponer a las enzimas a soluciones acuosas a pH óptimo y liofilizarlas antes de realizar la catálisis en el medio no acuoso (Klibanov, 1997; Klibanov, 2001).

Entre las ventajas de la enzimología no acuosa se puede nombrar la extensión de la catálisis a sustratos no polares, el cambio del equilibrio termodinámico hacia reacciones de síntesis, la reducción de reacciones secundarias dependientes de agua, la eliminación de contaminación microbiana y el aumento de la estabilidad térmica de las enzimas, entre otras (Dordick, 1989).

## 2.5 El agua en la catálisis no acuosa

El agua juega un papel muy importante en la actividad enzimática formando interacciones no covalentes en la estructura de la enzima, que le permiten conservar su conformación activa. En catálisis acuosa el agua no es un parámetro importante puesto que se encuentra en exceso y el cambio de concentración de ésta es despreciable. Sin embargo, cuando nos trasladamos a un medio no acuoso, ésta se convierte en muchos casos en una variable importante (Dordick, 1989; Zaks y Klivanov, 1998; Mesiano et al., 1999; Krishna, 2002). Por su parte, el parámetro termodinámico actividad de agua ( $a_w$ ), puede ser empleado para reportar la cantidad de agua disponible en las reacciones enzimáticas o en cualquier sistema. Este parámetro relaciona la presión de vapor en el sistema con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Aunque que es indiscutible la importancia de la presencia de agua (o  $a_w$ ), la cantidad necesaria de ésta depende de la enzima y reacción con que se trabaje (Dordick, 1989; Krishna, 2002).

## 2.6 Fluidos comprimidos: uso de 1,1,1,2 tetrafluoroetano líquido

El TFE pertenece al grupo de los freones hidrofluorocarbonos (HFC) con nombre comercial SUVA R-134a o HFC 134a (Dupont). Los HFC son moléculas pequeñas formadas por átomos de hidrógeno, flúor y carbono que tomaron gran importancia después del Protocolo de Montreal, ya que a diferencia de los compuestos clorofluorocarbonados, no causan deterioro en la capa de ozono. Debido a sus propiedades termodinámicas, el TFE actualmente sustituye al compuesto clorofluorocarbonado R-12, empleado por décadas en gran escala como refrigerante en aires acondicionados automotrices y de forma menos importante en refrigeración doméstica y como propelante (Corr, 2002). Al igual que el  $scCO_2$ , el TFE es un gas de efecto invernadero con un tiempo relativamente largo de degradación; sin embargo, su manipulación se puede diseñar en sistemas cerrados con completo reuso gracias a sus propiedades evaporativas.

El TFE es un compuesto no flamable, poco miscible en agua y miscible en un número importante de disolventes orgánicos. Su punto de ebullición es  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; por lo que a temperatura y presión ambiente se encuentra como gas. Es comercializado como gas licuado con una densidad de  $1206\text{ kg/m}^3$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una característica importante de este HFC es que aun siendo hidrófobo, es más polar que algunos disolventes orgánicos hidrofóbicos como el hexano y similar a otros como diclorometano o tetrahidrofurano, lo cual favorece la solubilidad de sustratos polares (Corr, 2002).

Otras de las propiedades físicas que hacen atractivo el uso de TFE líquido en aplicaciones distintas a la refrigeración industrial se basa en su baja viscosidad y baja tensión superficial, propiedades que permiten una rápida penetración al soluto y una alta difusión del disolvente en el soluto. De aquí que el TFE líquido sea susceptible de emplearse como disolvente en la extracción de compuestos de origen natural. Además, está aprobado para uso en alimentos, por lo que representa una alternativa al empleo de  $\text{scCO}_2$  (Corr, 2002).

Como es sabido, el uso de  $\text{scCO}_2$  en la extracción selectiva de compuestos de origen natural permite la obtención de productos con una cantidad mínima de impurezas. Sin embargo, el costo de equipo relacionado a las altas presiones de operación (arriba de 75 bar) representa la principal limitante para el empleo de este fluido supercrítico. De aquí que el TFE líquido represente una alternativa atractiva ya que las presiones de operación requeridas son mucho menores (alrededor de 20 bar), lo que representa menores costos de equipo con respecto al  $\text{scCO}_2$  (Corr 2002; Gimeno et al., 2007).

Entre las aplicaciones reportadas en la literatura científica se encuentra el uso de TFE líquido en la formación de partículas finas, con aplicaciones en la síntesis de medicamentos (Gimeno et al., 2005) o incluso extracción de pigmentos (Corr, 2002; Gimeno et al., 2007). Otra de las de las aplicaciones reportadas es el empleo de TFE líquido como medio en reacciones catalizadas enzimáticamente (García-Arrazola et al., 2007; Castillo Ruz, 2010; López-Luna et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la hidrólisis de diésteres de luteína es susceptible

de realizarse enzimáticamente (Zorn et al., 2003; González Mejía, 2006; Montenegro Pereira, 2007; Mora-Pale et al., 2007; Mora Pale, 2007). Con base en todo lo anterior este trabajo fue desarrollado para evaluar el empleo de TFE líquido como medio en la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína como alternativa de interés a la desesterificación enzimática en disolventes orgánicos o en scCO<sub>2</sub>.

### **3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### 3.1 Hipótesis

El TFE líquido, por sus propiedades físicas (tensión superficial, viscosidad, hidrofobicidad, entre otras), puede emplearse como medio de reacción en la hidrólisis de diésteres de luteína provenientes de la flor de cempasúchil catalizada por la lipasa comercial de *Rhizomucor miehei* inmovilizada como alternativa al uso de solventes orgánicos como medio de reacción.

#### 3.2 Objetivo general

Evaluar el TFE en estado líquido a bajas presiones como disolvente para la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), como alternativa amigable con el medio ambiente, y con beneficios sobre la pureza del producto final.

##### 3.2.1 Objetivos específicos

- Evaluar mediante un estudio cinético el efecto de la temperatura, la presión y la actividad inicial de agua del biocatalizador (lipasa de *Rhizomucor miehei*) sobre la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína en TFE.
- Determinar la temperatura, la presión y la actividad inicial de agua del biocatalizador que permitan obtener la mayor conversión de sustrato.
- Mediante la creación de curvas de velocidad inicial determinar las constantes cinéticas de esta reacción de hidrólisis, que permitan la caracterización cinética del sistema en estudio.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGIA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Sustrato

Oleoresina de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), con 80% w/w de diésteres de luteína, donada por la empresa Bioquimex Natural S.A. de C.V.

#### 4.1.2 Enzima

Lipozyme RM IM, nombre comercial de la lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico (Duolita AS68), de tamaño de partícula de 300-600µm, amablemente donada por Novozymes, México.

#### 4.1.3 Reactivos y disolventes

- Acetato de etilo grado HPLC, J.T. Baker.
- Acetona grado industrial, Quimica Barsa S.A. de R.L.
- Hexano grado industrial, Quimica Barsa S.A. de R.L.
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker.
- Nitrógeno grado industrial,
- 1,1,1,2 Tetrafluoroetano 98% (R-134a), DuPont Suva.

#### 4.1.4 Equipo

- Agitador magnético Thermolyne modelo 1000.
- Balanza analítica Ohaus modelo AP2105.
- Bomba de pistones ISCO modelo 100DX.
- Bomba de vacío
- Congelador Revco Legaci modelo ULT390.



- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Hewlett Packard serie 1100 equipado con bomba cuaternaria y sistema de detección con arreglo de diodos.
- Medidor de actividad de agua Rotronic.
- Reactor de alta presión equipado con agitación y control de temperatura con capacidad de 40mL.
- Titulador Karl-Fischer marca Mettler Toledo modelo DL32.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Ajuste de actividad de agua

El reactor cargado con enzima y sustrato se conectó a una bomba de vacío durante 12 horas con la finalidad de alcanzar el valor de actividad de agua  $\leq 0.16$ . Para  $a_{wi} = 0.45$  se tomó enzima directamente del recipiente donde se encuentra almacenada; para  $a_{wi} = 0.70$  el biocatalizador se colocó en una atmósfera de aire saturada a una humedad relativa de 70% (solución sobresaturada de KI), a 4 °C por 60 horas.

### 4.2.2 Hidrólisis de diésteres de luteína en TFE

Para las reacciones de hidrólisis de diésteres de luteína se pesaron las cantidades determinadas de enzima y sustrato para cada experimento y se colocaron en el reactor, previo a su cierre con la tapa correspondiente (la actividad de agua es ajustada según la metodología descrita con anterioridad). El TFE fue alimentado al reactor hasta una presión intermedia mediante la bomba de alta presión ISCO. El reactor fue calentado a la temperatura de operación, seguido del suministro adicional de fluido comprimido hasta la presión de trabajo. Este momento fue considerado como el tiempo de inicio de la reacción. Una vez transcurrido cierto tiempo, el reactor fue enfriado aproximadamente a 5 °C en un cuarto frío con la finalidad de detener la reacción por la insolubilidad de los

diésteres en TFE. La luteína, monoésteres y diésteres fueron recuperados del reactor con acetona mediante el lavado de sus paredes y los productos absorbidos al soporte de la enzima fueron recuperados de igual forma. El extracto fue evaporado parcialmente empleando una corriente de nitrógeno hasta alcanzar un volumen de 40 mL de donde se tomó una alícuota de 1mL que fue llevada a sequedad. Posteriormente se resuspendió en la fase móvil para su análisis por HPLC. En la figura 12 se presenta un esquema general del sistema de reacción.

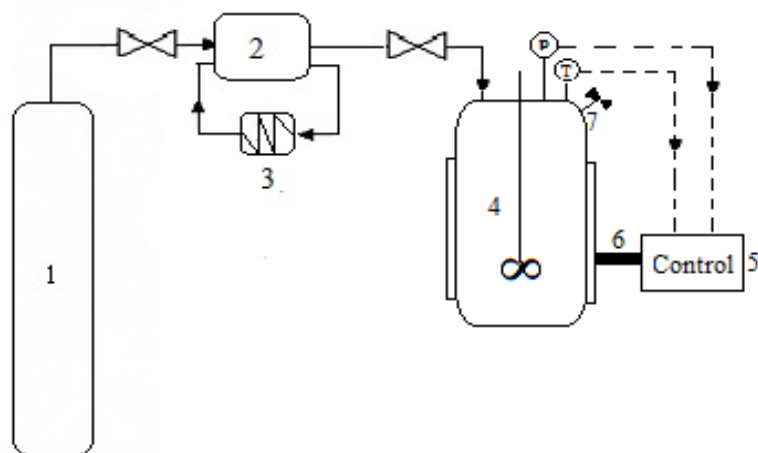


Figura 12. Diagrama esquemático del sistema de reacción. 1) tanque de TFE; 2) bomba de alta presión conectada a un sistema de enfriamiento; 3) baño de enfriamiento; 4) reactor; 5) control; 6) chaqueta de calentamiento; 7) válvula de alta presión; P) indicador de presión; T) indicador de temperatura.

#### 4.2.3 Inactivación de la enzima

Con el objetivo de evaluar si la hidrólisis ocurría en ausencia de actividad enzimática y de determinar si el soporte de la enzima podría catalizar la reacción, se llevó a cabo un experimento en las mismas condiciones pero con enzima inactivada. Para ello la enzima fue sometida a una temperatura de 120 °C por 20 minutos en autoclave y posteriormente se corroboró la ausencia de actividad mediante una reacción modelo.

#### 4.2.4 Análisis de muestras

El análisis de las reacciones se realizó mediante HPLC operado a temperatura ambiente en una columna de fase reversa Waters X-Terra (RP<sub>18</sub> 5µm; 4.6 x 150 mm) y una precolumna de la misma fase estacionaria. La detección se realizó a 446 nm; el flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min, el volumen de muestra de 10 µL. La fase móvil empleada fue MeOH:AcEt 70:30 v/v.

El contenido de agua del biocatalizador previamente ajustado y equilibrado a una  $a_{wi}$  fue determinado mediante una titulación coulombimétrica Karl-Fischer

#### 4.2.5 Diseño experimental

El método de Taguchi permite encontrar factores de control óptimos para obtener productos o procesos menos sensibles a variaciones ambientales mediante el empleo de arreglos ortogonales definidos y de un método estándar para el análisis de datos que introduce la razón señal ruido S/N como medida cualitativa del sistema (Condra, 1993). Por otra parte, el análisis de varianza ANOVA permite realizar una estimación cuantitativa del efecto de los factores sobre la variable de respuesta (Condra, 1993; Gaitonde et al., 2008; López Jiménez, 2010).

Se empleó un diseño experimental de Taguchi (arreglo L9), el cual mediante nueve experimentos permitió conocer de forma general el efecto de la temperatura, la presión, la concentración de enzima y la  $a_{wi}$  sobre la conversión de diésteres de luteína.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados de acuerdo al método de Taguchi. Paralelamente se realizó un ANOVA (análisis de varianza) con los datos experimentales con el propósito de conocer la contribución de cada una de los factores estudiadas sobre la variación de la conversión de sustrato.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Pruebas preliminares de validación de actividad enzimática en TFE líquido

Se realizaron experimentos iniciales para evaluar la actividad del biocatalizador para hidrolizar los diésteres de luteína en el medio en estudio, fijando la presión y la temperatura de operación a 25 bar y 55 °C, respectivamente.

En todos los casos la concentración de enzima y sustrato empleadas fueron de 0.5% w/v y 80 µM, mientras que la actividad de agua inicial,  $a_{wi}$ , del biocatalizador fue  $\leq 0.16$ . Los resultados se muestran en la Figura 13.

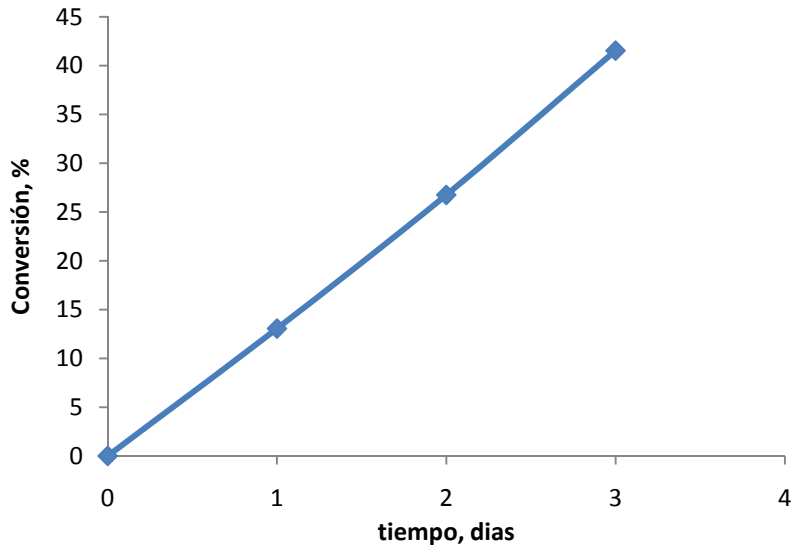


Figura 13. Hidrólisis de DL en TFE líquido.

El porcentaje de conversión está dado por la ecuación 1:

$$\% \text{ Conversión} = \frac{S_0 - S_1}{S_0} * 100$$

(1)

Donde  $S_0$  y  $S_1$  representan las concentraciones inicial y final de sustrato (diésteres de luteína).

Los resultados obtenidos fueron inferiores a los reportados para  $scCO_2$  donde se alcanzó 70% de conversión en 24 h de reacción (Mora-Pale et al., 2007; Mora Pale, 2007). Sin embargo, de manera relevante se demostró que es posible llevar a cabo la hidrólisis enzimática en TFE. Debido a las ventajas operacionales respecto a la presión para este medio de reacción (en contraste con  $scCO_2$ ), se decidió evaluar presión, temperatura,  $a_{wi}$ , del biocatalizador y concentración de enzima con el propósito de mejorar la conversión del sustrato. Para ello se usó un diseño experimental tipo Taguchi.

## 5.2 Arreglo de Taguchi

En este trabajo se empleó un arreglo de Taguchi L9, el cual permite evaluar en nueve tratamientos experimentales cuatro factores a tres niveles cada uno, según se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Experimentos arreglo de Taguchi L9.

Número de experimento	Temperatura °C	Presión bar	Enzima % $w/v$	$a_{wi}$
1	50	25	0.375	$\leq 0.16$
2		60	0.500	0.45
3		120	0.625	0.70
4	55	25	0.500	0.45
5		60	0.625	$\leq 0.16$
6		120	0.375	0.45
7	65	25	0.625	0.45
8		60	0.375	0.70
9		120	0.500	$\leq 0.16$

Los experimentos se realizaron por triplicado, estableciéndose 24 horas como tiempo de reacción y a una concentración inicial de sustrato de 80  $\mu M$ . Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de experimentos.

Número de experimento	Temperatura °C	Presión bar	Enzima % w/v	$a_{wi}$	Conversión %
1	50	25	0.375	$\leq 0.16$	9.07
2		60	0.500	0.45	7.20
3		120	0.625	0.70	9.14
4	55	25	0.500	0.70	20.56
5		60	0.625	$\leq 0.16$	11.10
6		120	0.375	0.45	9.14
7	65	25	0.625	0.45	76.83
8		60	0.375	0.70	17.36
9		120	0.500	$\leq 0.16$	15.46

### 5.2.1 Cociente señal-ruido, S/N

A continuación se calcula el cociente señal-ruido, S/N, el cual está dado por la ecuación

$$S/N = -10 \log(MSD) \quad (2)$$

La desviación cuadrada media, MSD, es una medida de la dispersión de los datos experimentales y su cálculo depende de la evaluación de los efectos. Existen tres clases de análisis estadísticos, *menor es mejor*, *mayor es mejor* y *nominal es mejor*. Puesto que se desea obtener la máxima conversión, se empleó el análisis de tipo *mayor es mejor*, para este caso

$$MSD = \frac{\frac{1}{Y_1^2} + \frac{1}{Y_2^2} + \dots + \frac{1}{Y_n^2}}{n} \quad (3)$$

Y representa el resultado de cada experimento y  $n$  es el número de repeticiones por ensayo.

Tabla 7. Cálculo de S/N

Número de Experimento	Promedio $\bar{X}$	MSD	S/N
1	9.07	0.0150	18.24
2	7.20	0.0204	16.90
3	9.14	0.0132	18.78
4	20.56	0.0024	26.24
5	11.10	0.0082	20.84
6	9.14	0.0120	19.21
7	76.83	0.0002	37.71
8	17.36	0.0033	24.78
9	15.46	0.0047	23.32

En la Tabla 7 se observa que el experimento número siete alcanzó la mayor conversión (76%), la cual es comparable con los resultados en  $\text{scCO}_2$  (70%) reportados y mucho mayor a los resultados obtenidos empleando hexano como medio de reacción (aproximadamente 30%) (Mora-Pale et al., 2007).

### 5.2.2 Análisis de varianza

Para conocer el efecto de cada factor sobre la conversión, se construyó el gráfico de efectos y se realizó un análisis de varianza ANOVA.

Donde  $\bar{X}_{ij}$  está dada por

$$\bar{X}_{ij} = \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \bar{X}_i \quad (4)$$

mientras que

$$S/N_{ij} = \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 S/N_i \quad (5)$$

$i=1,2,3,4$  representa a los factores y  $j=1,2,3$  los niveles de cada factor.

Los grados de libertad, G.L., para un arreglo de Taguchi son iguales al número de niveles del factor menos uno.

La suma total de cuadrados fue determinada empleando las ecuaciones 6 y 7,

$$SS_T = \sum_{n=1}^9 (S/N_n - \overline{S/N})^2 \quad (6)$$

$$\overline{S/N} = \frac{1}{n} \sum_{n=1}^9 S/N_n \quad (7)$$

Donde n representa el número de experimentos.

Empleando la ecuación 8 se obtuvo la suma de cuadrados debido a los niveles de cada factor  $SS_i$

$$SS_i = 3 \sum_{j=1}^9 (S/N_{ij} - \overline{S/N})^2 \quad (8)$$

$S/N_{ij}$  representa la razón ruido señal ruido del factor  $i$  al nivel  $j$ .

La varianza del factor  $i$ ,  $V_i$  es la variación del factor corregida por los grados de libertad,

$$V_i = \frac{SDC_i}{G.L.} \quad (9)$$

La contribución de cada factor sobre la respuesta está dada por la ecuación 10.



$$\rho_i = \frac{SS_i}{SS_T} \tag{10}$$

Tabla 8. Análisis de varianza

Factor	Nivel	$\bar{X}_{ij}$	$\overline{S/N}_{ij}$	G.L	SDC <sub>i</sub>	V <sub>i</sub>	Efecto, %
Temperatura	T1	8.47	17.97	2	172.27	86.13	<b>53</b>
	T2	13.60	22.10				
	T3	36.55	28.60				
Presión	P1	35.48	27.40	2	91.53	45.77	<b>28</b>
	P2	11.89	20.84				
	P3	11.25	20.44				
[Enzima]	E1	11.86	20.74	2	40.50	20.25	<b>12</b>
	E2	14.41	22.15				
	E3	32.36	25.78				
a <sub>wi</sub>	A1	11.88	20.70	2	22.40	11.20	<b>7</b>
	A2	31.05	24.61				
	A3	15.69	23.27				

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 8, la temperatura tiene un efecto importante sobre la conversión, contribuyendo en un 53.28%, la presión contribuye con un 28.31% mientras que la concentración de enzima y la actividad inicial de agua del biocatalizador contribuyen con un 12.5 y 6.93% en la variación de la conversión, respectivamente, lo que permite orientar el manejo de variables que lleven a una optimización del proceso.

### 5.2.3 Gráfico de efectos

Otra herramienta importante en el análisis de resultados es el gráfico de efectos, ya que permite observar el efecto que el cambio de nivel de cada variable tiene sobre la relación señal ruido S/N.

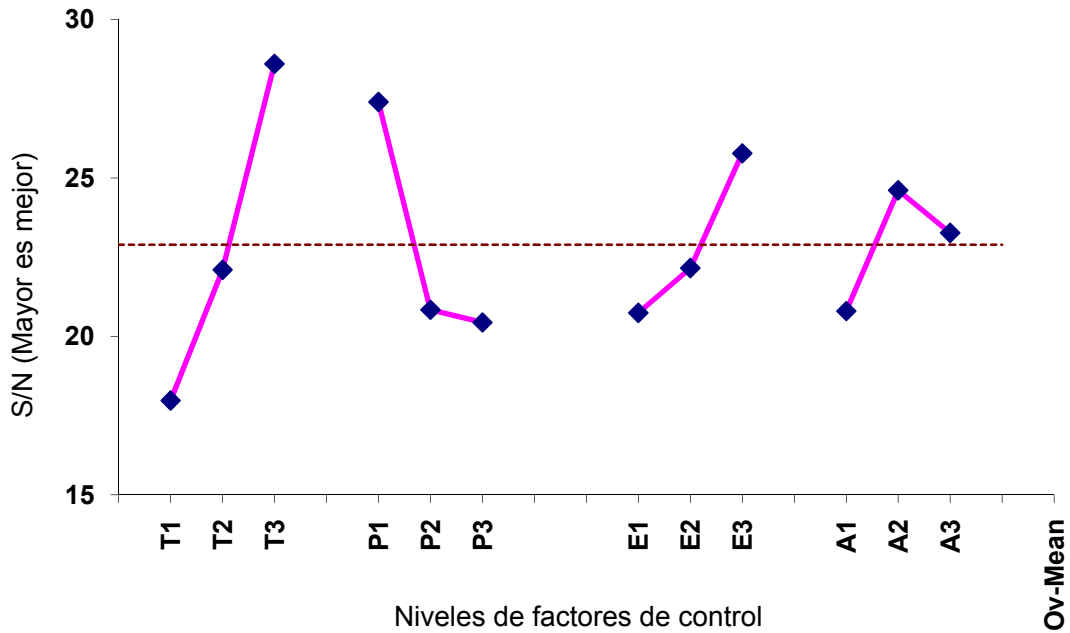


Figura 14. Gráfico de efectos.  
T; temperatura. P: presión. E: Concentración de enzima. A:  $a_{wi}$

El gráfico de efectos (Figura 14) muestra que el aumento de temperatura produce un efecto positivo, mientras que el aumento de la presión tiene un efecto adverso sobre la relación señal ruidos S/N, que es interpretado como negativo en la conversión de diésteres.

Por otro lado, una mayor de concentración de enzima produce un aumento en la conversión, lo cual es de esperarse puesto que una mayor cantidad de enzima representa más sitios activos disponibles para la catálisis.

En el gráfico se observa que la relación S/N aumenta cuando la actividad agua inicial de la enzima aumenta de  $\leq 0.16$  a  $0.45$  mientras que al aumentar la  $a_{wi}$  a  $0.70$  la relación S/N disminuye, aunque a un valor por encima de la media.

### 5.3 Pruebas de solubilidad

Con el propósito de tener una visión de lo que sucede en el reactor y contar con una mejor idea de cómo interaccionan los componentes del sistema, se

realizaron pruebas de solubilidad empleando un reactor de alta presión provisto de mirillas de zafiro, las cuales nos permiten observar el llenado del reactor con TFE líquido, la agitación y la solubilidad de los componentes del sistema.



Figura 15. Reactor con mirillas.



Figura 16. Vista lateral de reactor de mirillas cargado con diésteres, enzima y TFE

En la Figura 16 se presenta una fotografía del reactor con mirillas cargado con biocatalizador, diésteres y TFE; la mancha naranja observada en la parte superior de la mirilla corresponde a los diésteres de luteína. Dicha mancha indica que a temperatura ambiente los diésteres de luteína son insolubles en el medio de reacción.



Figura 17. Reactor de mirillas, T= 50 °C

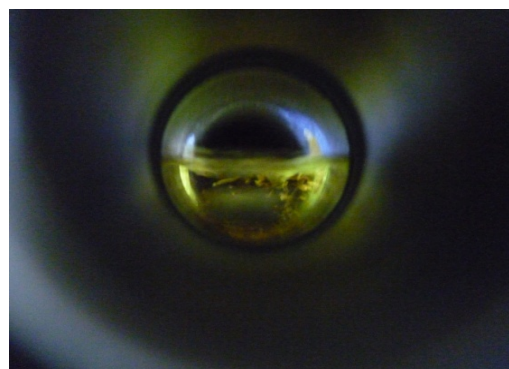


Figura 18. Reactor de mirillas, T= 65° C

El las Figuras 17 y 18 se observa el reactor a una temperatura a de 50 y 65°C, respectivamente. Como se aprecia en la Figura 19, el TFE ha adquirido un color naranja, resultado de la disolución de los DL; se observa también la enzima, la cual es insoluble en el medio. Claramente el aumento de la temperatura de operación aumenta la solubilidad de los diésteres, logrando la disolución total del sustrato a 65 °C.

A partir de lo observado se tiene una idea clara del efecto de la temperatura sobre el sistema actuando en dos sentidos. Por un lado a mayor temperatura se logra una mejor solubilidad de los diésteres, lo que posibilita el acceso del sustrato a los sitios activos del biocatalizador, y por otra parte el aumento de temperatura tiene un efecto termocinético positivo sobre la velocidad de la reacción, en tanto el catalizador mantenga su actividad.

Una vez conocido el comportamiento del sistema ante los cambios de las variables de estudio, se decidió realizar otro conjunto de experimentos, para establecer si existen valores de temperatura, concentración de enzima y  $a_{wi}$  que maximicen la tasa de hidrólisis de diésteres de luteína.

### 5.4 Diseño factorial $2^3$

Puesto que el gráfico de efectos y la prueba de solubilidad indican que el aumento de temperatura favorece la reacción, resulta importante conocer si una temperatura por encima de los 65 °C aumentaría la conversión o si por el contrario provocaría la inactivación enzimática o la degradación de los diésteres de luteína. Para ello se propuso un diseño factorial  $2^3$ , presentado en la Tabla 9, con el que se pretende evaluar en ocho tratamientos experimentales el efecto sobre la reacción de hidrólisis temperaturas superiores a 65 °C

Tabla 9. Experimentos diseño factorial  $2^3$ 

Experimento	Temperatura °C	Enzima % w/v	$a_{wi}$
1	65	0.500	0.45
2	70	0.500	0.45
3	65	0.625	0.45
4	70	0.625	0.45
5	65	0.500	0.70
6	70	0.500	0.70
7	65	0.625	0.70
8	70	0.625	0.70

El tiempo de reacción fue de 24 h para todos los casos, mientras que la presión de operación fue 25 bar (fijada en base a los experimentos anteriores) y la concentración inicial del sustrato de 80  $\mu$ M. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Las temperaturas evaluadas fueron 65 y 70 °C, y se varió la concentración de enzima a 0.50 y 0.625 %  $W/V$  puesto que se quería determinar si el efecto cinético provocado al aumentar la temperatura es tal que compense la disminución de enzima en el sistema. Por otro lado, se decidió evaluar dos niveles de  $a_{wi}$ , esto debido a que los resultados arrojados en el arreglo de Taguchi no mostraron ser contundentes en su efecto.

A continuación se presentan los resultados obtenidos

Tabla 10. Resultados diseño  $2^3$ 

Experimento	Conversión, %		
	Valores observados		Promedio
1	45.02	37.84	41.43
2	40.52	43.06	41.79
3	77.27	76.39	80.83
4	91.73	89.64	90.68
5	62.77	60.33	61.55
6	53.75	53.89	53.82
7	80.63	73.14	76.88
8	93.23	90.16	91.69

En la tabla 10 se observa que en el experimento 8 se logró la mayor conversión. Los experimentos en los que se registró mayor conversión, correspondieron a aquellos con una concentración de enzima igual a 0.625% w/v. También el aumento de temperatura de 65 a 70 °C produjo un aumento en la conversión (Figuras 19 y 20). Por otra parte, para una concentración de biocatalizador igual a 0.500% w/v, el aumento de temperatura no parece tener un efecto importante sobre la conversión.

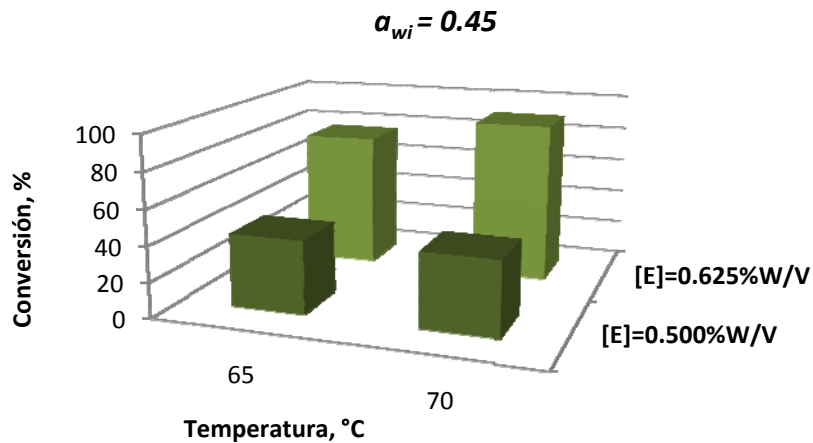


Figura 19. Conversión en función de la temperatura.  
 P = 25bar, t = 24h,  $\alpha_{wi} = 0.45$ , [DL]= 80  $\mu$ M

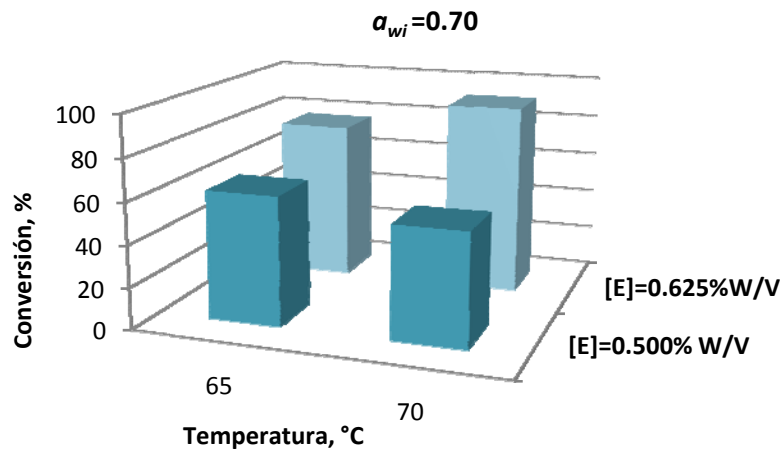


Figura 20. Conversión en función de la temperatura.  
 P=25bar, t=24h,  $\alpha_{wi}=0.70$ , [DL]= 80 $\mu$ M

El cambio de  $a_{wi}$  de 0.45 a 0.70 parece tener poco efecto sobre la tasa de hidrólisis tanto a 65 como a 70 °C.

Tabla 11. Efecto de  $a_{wi}$

Concentración de enzima %w/v	Temperatura °C	$a_{wi}$	Conversión %
0.625	65	0.45	80.83
		0.70	80.88
	70	0.45	90.68
		0.70	91.69

### 5.5 Evaluación de la concentración de enzima

Puesto que la concentración de enzima parece ser la variable con mayor influencia, se fijó la temperatura de la reacción a 65 °C y se realizaron experimentos aumentando la cantidad de biocatalizador (a 25 bar y  $a_{wi} = 0.45$ ). Para incrementar el intervalo de estudio se evaluaron concentraciones de enzima a 0.70 y 1% w/v.

En la Figura 21 se observa el efecto del aumento de concentración de biocatalizador sobre la reacción. Se aprecia que el aumento de biocatalizador de 0.625% w/v a 0.70 y 1.0% w/v no produce una mejora importante sobre la conversión, a diferencia del aumento de 0.50 a 0.625 % w/v, donde la conversión subió de 41% a 77%. Lo anterior indica que la concentración óptima de enzima es 0.625 % w/v.

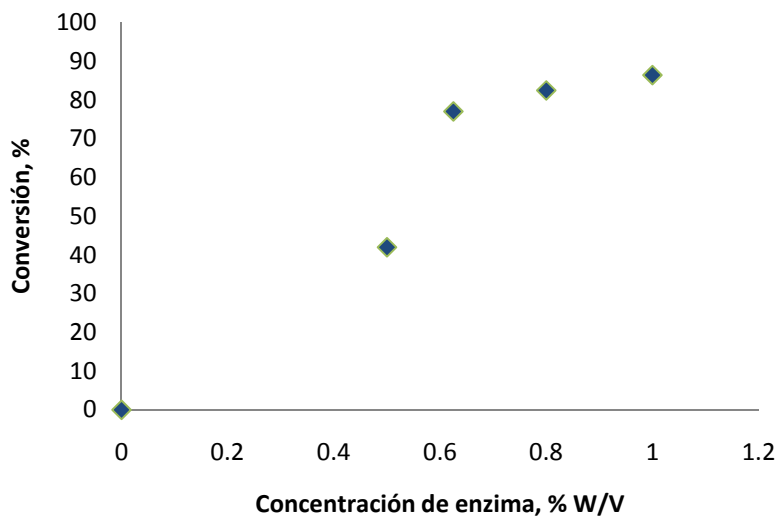


Figura 21. Efecto de la concentración de enzima,  $T= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P= 25\text{bar}$ ,  $[E]= 0.625\% \text{ W/V}$ ,  $[DL]= 80\mu\text{M}$ ,  $a_{wi}= 0.45$

### 5.6 Hidrólisis de diésteres de luteína en función del tiempo

Con base en los resultados obtenidos se decidió realizar un seguimiento de la reacción a lo largo del tiempo a las mejores condiciones experimentales obtenidas:  $P= 25\text{ bar}$ , concentración de biocatalizador =  $0.625\% \text{ w/v}$ ,  $a_{wi}$  de  $0.45$  y  $0.70$  y temperaturas de  $65$  y  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La concentración inicial de diésteres para todos los casos fue de  $80\text{ }\mu\text{M}$ . A  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y tiempo de reacción mayor a  $1.5$  el sustrato y productos son inestables, por lo que en experimentos posteriores se fijó  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  como temperatura de operación.

Como se observa en el gráfico de la Figura 22, para  $a_{wi} = 0.45$  la reacción ocurre principalmente durante el primer día, seguido de un aumento de  $5\%$  hasta alcanzar  $80\%$  de conversión.



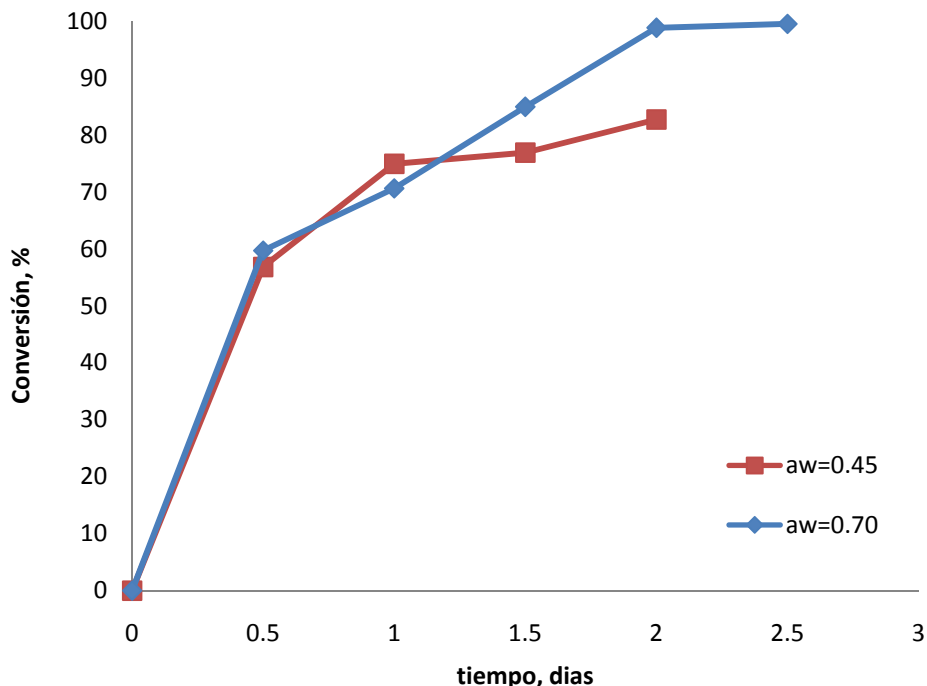


Figura 22. Hidrólisis de diésteres de luteína en función del tiempo.,  
 $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 25\text{bar}$ ,  $[E] = 0.625\% \text{ W/V}$ ,  $[DL] = 80\mu\text{M}$

Por otro lado a  $a_{wi} = 0.70$ , se presenta un comportamiento similar en el primer día, sin embargo, esto es procedido de un aumento paulatino en la conversión hasta alcanzar el 98%.

Debido a que los monoésteres de luteína son productos intermedios en la reacción de hidrólisis, los resultados no reflejan el rendimiento de luteína propiamente, sino la conversión del diéster inicial. Aunque no se cuenta con estándares de monoésteres ni de luteína libre, se conoce la estequiometría de la reacción y la relación de áreas, con lo que podemos conocer las concentraciones de los compuestos que participan en la reacción (González Mejía, 2006).

La Figura 23 corresponde a un cromatograma de uno de los experimentos; la luteína libre eluye entre los 2 y 3 minutos, los monoésteres entre 3 y 4 minutos y los diésteres lo hacen a partir de los cuatro minutos. La diferentes picos observados a los tiempos de elución de los monoésteres y diésteres, son el resultado de las diferentes ácidos grasos a los que se encuentra esterificada la luteína.

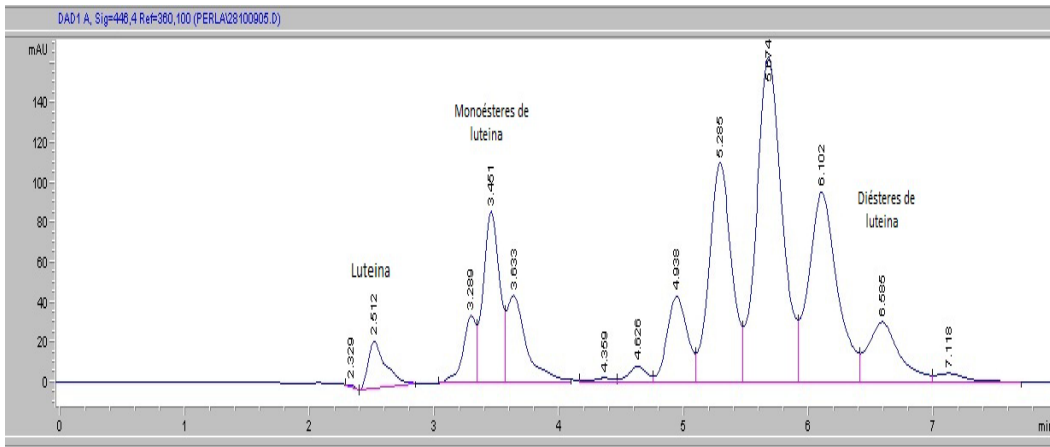


Figura 23. Cromatograma de la hidrólisis de diésteres de luteína en TFE líquido.

En la Figura 24 se presenta los perfiles de concentración de la luteína, monoésteres y diésteres a  $a_{wi} = 0.45$ , donde se observa que en el primer día la concentración de monoésteres alcanza su máximo, seguida de una disminución paulatina, mientras que la concentración de luteína libre crece en forma sostenida con el tiempo.

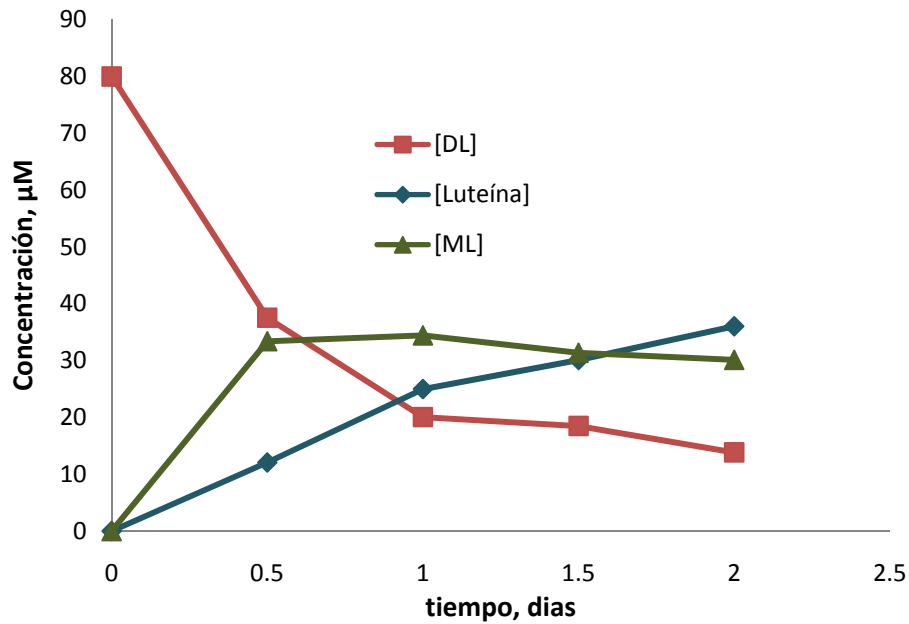


Figura 24. Perfiles de concentración de luteína, monoésteres y diésteres.  $a_{wi} = 0.45, T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}, P = 25\text{bar}, [E] = 0.625\% \text{ W/V}, [DL] = 80\text{ }\mu\text{M}$

Por otro, lado las especies presentes en la reacción siguen el mismo patrón a  $a_{wi} = 0.70$ , como lo muestra la Figura 25. Sin embargo, la reacción es más rápida, y aunque al día y medio se alcanza casi la totalidad de la conversión de los DL, la hidrólisis de los monoésteres para producir luteína libre se sigue llevando a cabo, hasta alcanzarse una concentración final de luteína de alrededor de 60  $\mu\text{M}$ .

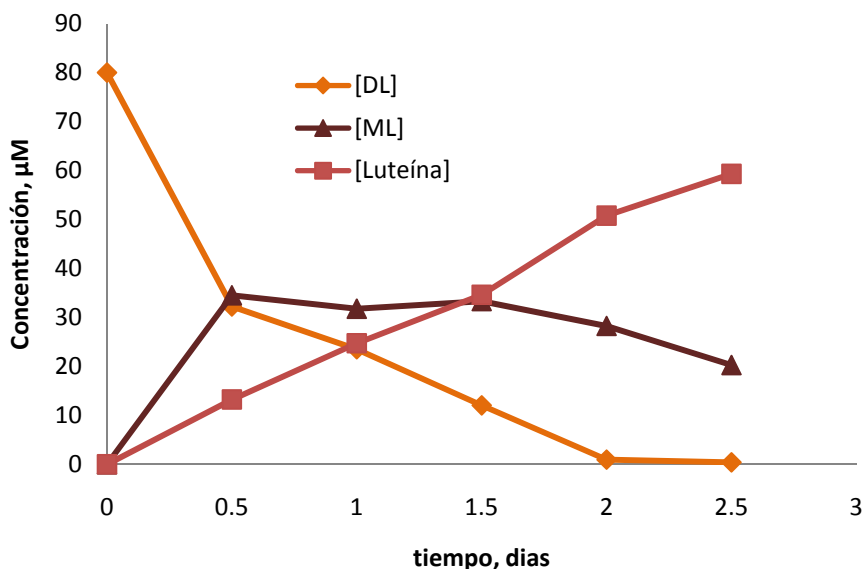


Figura 25. Perfil de concentración de luteína, monoésteres y diésteres.  
 $a_{wi} = 0.70$ ,  $T = 65^\circ\text{C}$ ,  $P = 25\text{bar}$ ,  $[E] = 0.625\% \text{ W/V}$ ,  $[\text{DL}] = 80 \mu\text{M}$

Los resultados presentados en la sección anterior muestran que la cantidad de agua presente en el sistema de reacción esta relacionada de manera importante con la velocidad de hidrólisis. Resultados reportados para la misma reacción enzimática en hexano, isooctano e incluso en  $\text{scCO}_2$  (si bien la concentración de enzima es diferente) señalan que las mayores conversiones ocurren a  $a_{wi} \leq 0.23$ ; mientras que en este trabajo el aumento de  $a_{wi}$  produjo un aumento en la velocidad de reacción (hasta  $a_{wi} = 0.70$ ), lo cual es atribuido a que a diferencia de los solventes orgánicos empleados en estudios anteriores, el TFE líquido puede disolver cierta cantidad de agua.

5.7 Agua en la reacción

5.7.1 Agua presente en función de  $a_{wi}$

La cantidad de agua presente en el biocatalizador en función de  $a_{wi}$  fue determinada mediante una titulación Karl-Fischer, los resultados son presentados en la Tabla 12.

Tabla 12 Agua presente en función del  $a_{wi}$

$a_{wi}$	% base seca	agua presente, $\mu\text{mol}$
0.45	8	1113
0.70	9	1257

5.7.2. Consumo teórico de agua

A partir de la estequiometría de la reacción se determinaron los moles de agua necesarias para hidrolizar los diésteres presentes en una concentración de 80  $\mu\text{M}$



$$\text{Cantidad de diésteres en el reactor } (\mu\text{mol}) = \frac{80 \mu\text{mol}_{DL}}{L_{\text{disolución}}} * 0.040L = 3.2 \mu\text{mol}_{DL}$$

$$\text{Cantidad de agua } (\mu\text{mol}) = \frac{2 \mu\text{mol}_{\text{agua}}}{\mu\text{mol}_{DL}} * 3.2 \mu\text{mol}_{DL} = 6.4 \mu\text{mol}_{\text{agua}}$$

En la Tabla 13 se presenta la cantidad de agua teórica consumida en función del  $a_{wi}$  según progresa la reacción.

Tabla 13. Agua consumida en función de  $a_{wi}$ . T= 65 °C, P= 25 bar, [E]= 0.625% w/v, [DL]= 80  $\mu$ M .

Tiempo, Días	$a_{wi}=0.45$			$a_{wi}=0.70$		
	Luteína, Mmol	ML, $\mu$ mol	Agua consumida teórica, $\mu$ mol	Luteína, $\mu$ mol	ML, $\mu$ mol	Agua consumida teórica, $\mu$ mol
0.5	0.48	1.34	2.30	0.53	1.38	2.44
1	1.00	1.38	3.38	0.99	1.27	3.25
1.5	1.20	1.25	3.66	1.39	1.33	4.10
2	1.44	1.21	4.09	2.03	1.13	5.19
2.5				2.37	0.81	5.56

Puesto que se necesitan 6.4  $\mu$ mol de agua para la hidrólisis completa del sustrato, se podría suponer que el agua se encuentra en exceso para ambas  $a_{wi}$ ; sin embargo, parte de esta agua presente se encontraría ligada por interacciones físicas al biocatalizador, por lo que no está disponible para actuar como sustrato en la hidrólisis.

### 5.7.3 Agua en el TFE

Jackson y colaboradores reportaron en 1995 la solubilidad del agua en scCO<sub>2</sub> y otros fluidos comprimidos (Jackson et al., 1995). La solubilidad de agua en TFE líquido es de 0.15% w/w, lo que permite conocer la cantidad de agua máxima que se disuelve en el medio de reacción.

Conociendo el volumen del reactor, la densidad del TFE a las condiciones de trabajo (1.0g/mL) y la solubilidad de agua, se determinó la cantidad máxima de agua que se disuelve en el sistema.

$$40mL_{TFE} * \frac{1.0g_{TFE}}{mL_{TFE}} * \frac{0.0015g_{agua}}{g_{TFE}} * \frac{1mol_{agua}}{18g_{agua}} * \frac{1 \times 10^6 \mu mol_{agua}}{1mol_{agua}} = 3333 \mu mol_{agua}$$

El TFE presente en el reactor podría disolver 3333 $\mu$ mol de agua, una cantidad mucho mayor a la que hay en el sistema a cualquiera de las dos  $a_{wi}$ . De aquí que se esperaría que el TFE no solo disuelva a los DL, sino también al agua

disponible para la reacción, y que ambos sustratos lleguen al sitio activo de la enzima mediante la difusión inicial del TFE en el soporte.

La rapidez de reacción es proporcional a la concentración de los sustratos (diésteres y agua); en las Figuras 24 y 25 se observa que al aumentar la concentración de agua mediante el aumento de  $a_{wi}$  mejora la velocidad de reacción. Este fenómeno es opuesto al reportado cuando el medio de reacción es un solvente orgánico (González Mejía, 2006; Montenegro Pereira, 2007; Mora-Pale et al., 2007; Mora Pale, 2007), donde el agua del biocatalizador representa una barrera para la entrada del sustrato disuelto en el solvente orgánico, esto por la inmiscibilidad de ambos componentes, los diferentes comportamientos son esquematizados en la Figura 26.

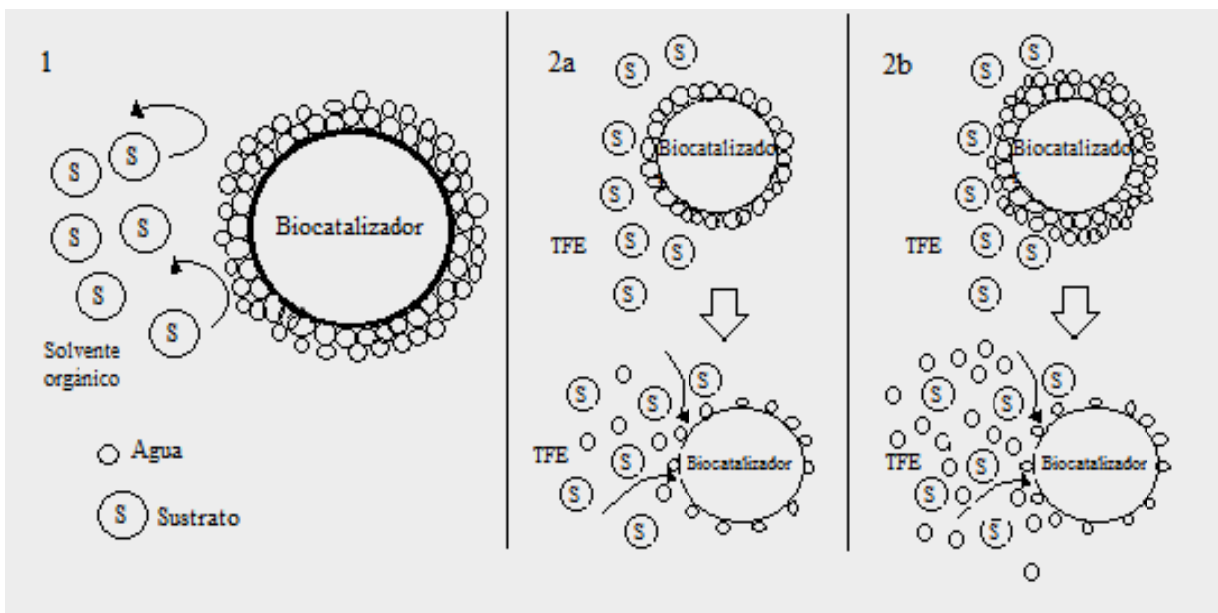


Figura 26. Representación del sistema de reacción a diferentes  $a_{wi}$ .

1. En solventes orgánicos: altos valores de  $a_{wi}$  el agua puede bloquear la entrada del sustrato al sitio activo.
2. En TFE : a)  $a_{wi}$  bajos , b) a altos  $a_{wi}$  la concentración de agua es mayor.

Por otro lado, el agua presente se disuelve en el TFE y entra al sitio activo de la enzima junto con el sustrato, por lo que al aumentar  $a_{wi}$  la concentración de agua aumenta observándose un aumento en la rapidez de reacción (Figura 28).

### 5. 8 Cinética de la reacción

Se construyeron las curvas de saturación a  $a_{wi}$  de 0.45 y 0.70 y a valores óptimos de temperatura y presión para determinar las constantes cinéticas aparentes para la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína en TFE líquido catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (Figura 28).

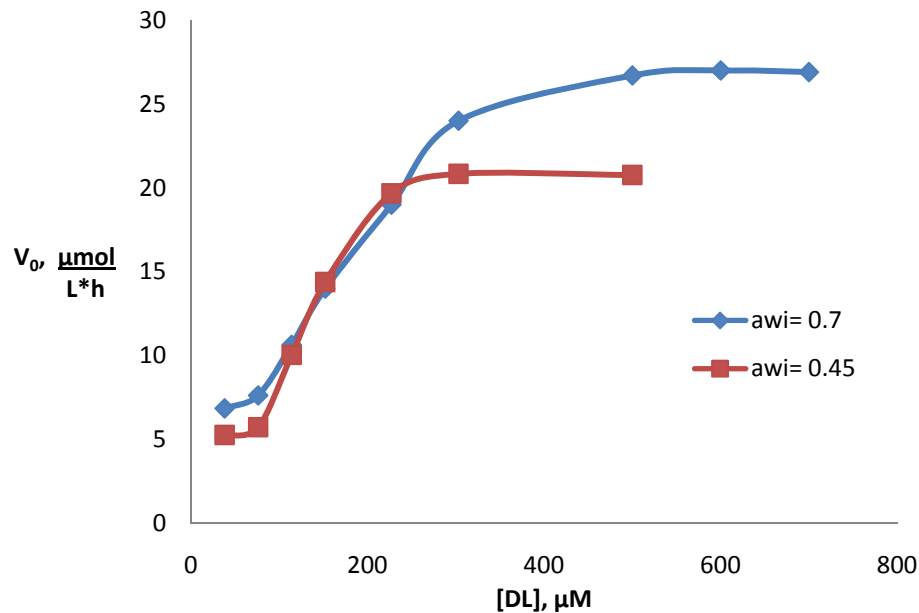


Figura 27. Curva de saturación de diésteres de luteína. T= 65 °C, P= 25 bar, [E]= 0.625% W/V.

Los datos obtenidos en el presente trabajo fueron ajustados mediante una regresión no lineal para conocer los parámetros cinéticos aparentes a partir de la ecuación de Hill (Fersht, 1980).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]^H}{S_{0.5}^H + [S]^H}$$

donde  $V_{max}$  es la velocidad límite a la que tiende la reacción cuando toda la enzima está saturada por el sustrato.

$S$  es la concentración de sustrato.

$S_{0.5}$  es la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la  $V_{max}$ , es decir, el 50% de saturación de la enzima por el sustrato.

$H$  es el número de Hill, que indica el tipo de cooperatividad.

Cuando  $H > 1$  implica que la cooperatividad es positiva, pero cuando  $H = 1$  no hay cooperatividad, luego la enzima sigue un comportamiento tipo Michaelis, entonces  $S_{0.5}$  es igual a  $K_m$ , mientras que  $H < 1$  indican que la cooperatividad es negativa.

Las constantes determinadas son aparentes, ya que la enzima se encuentra inmovilizada y no conocemos su concentración real. En la Tabla 14 se presentan los valores obtenidos.

Tabla 14. Constantes cinéticas aparentes.  
T= 65 °C, P= 25bar, [E]= 0.625% w/v

Constante	$a_{wi} = 0.45$	$a_{wi} = 0.70$
$V_{max_{ap}}, \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{h}}$	26.54	41.98
$S_{0.5_{ap}}, \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	169.48	336.46
$H$	1.45	1.02

A  $a_{wi} = 0.45$  el valor de  $H$  es mayor que 1 lo que indica una posible cooperación del sustrato. Esto sugiere la posible la formación de dímeros de sustrato que también pueden ser reconocidos por la enzima. Las curvas de saturación reportadas de la enzima de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RMIM) para la hidrólisis de diésteres de luteína en hexano presentan un comportamiento similar atribuido al posible efecto cooperativo del sustrato (Mora Pale, 2007). Por otro lado a  $a_{wi} = 0.70$  el número de Hill es cercano a uno, lo que indica un comportamiento tipo Michaelis.



Un criterio importante acerca la eficiencia catalítica de la enzima es la constante de especificidad,  $V_{max}/K_M$

Tabla 15. Constante de especificidad  
T=65°C, P=25bar, [E]=0.625% w/v

	$a_{wi} = 0.45$	$a_{wi} = 0.70$
$V_{maxap}/ K_{Map}, h^{-1}$	0.15	0.12

Como se observa, la diferencia de la constante de especificidad para los  $a_{wi}$  evaluados no alcanza un orden de magnitud, por lo que se considera que no existe diferencia significativa entre ellas lo que se nos permitiría asumir que no hay dominancia de una condición sobre otra. Este resultado podría deberse a que estamos en condiciones de velocidades iniciales en este punto, donde la concentración de sustrato permanece casi constante, y el agua disponible es suficiente para la hidrólisis. Sin embargo, se requieren estudios más profundos para soportar esta hipótesis.

Por otro lado, no se observó reacción a  $a_{wi} \leq 0.16$  después de un día de reacción. Es posible que el agua disponible para la reacción, aunque suficiente para hidrolizar la concentración inicial de DL, al ser disuelta por el TFE se encuentre diluida, provocando una rapidez de reacción muy baja. Para corroborar esta hipótesis se requeriría aumentar el tiempo de reacción. Un efecto de deshidratación de la enzima por parte del TFE es otra de las causas posibles de este comportamiento.

Los resultados presentados en el presente trabajo dan un panorama positivo para el empleo de TFE como medio de reacción en la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína respecto al empleo de hexano como medio de reacción. Sin embargo, estudios más profundos deben ser realizados orientados a mejorar la velocidad de hidrólisis, de tal forma que este procedimiento amigable con el

medio ambiente se convierta una alternativa viable, capaz de competir con los procesos tradicionales.

## 6. CONCLUSIONES

- La reacción de hidrólisis de diésteres de luteína catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* se puede llevar a cabo empleando TFE líquido como medio de reacción, con lo que se valida la hipótesis planteada al inicio de este trabajo.
- Mediante un arreglo de Taguchi L9 se encontraron la presión y temperatura óptimos de 25 bar y 65 °C, respectivamente.
- Los estudios de solubilidad del sustrato en TFE mostraron que la temperatura es una variable importante puesto que influye no solo en la cinética de la reacción sino que incrementa la solubilidad y disponibilidad de los diésteres de luteína. A temperaturas inferiores de 60 °C solo se observó la disolución parcial del sustrato.
- Experimentos realizados a temperatura, presión y concentración de enzima óptimos mostraron que a  $a_{wi} = 0.45$  la conversión del sustrato es de 85%. Cuando  $a_{wi} = 0.70$  es de 100% , ambos al segundo día de reacción, lo cual podría atribuirse a la mayor presencia de agua.
- En lo que a la actividad de agua inicial del biocatalizador se refiere, se encontró que la reacción es favorecida a valores altos de  $a_{wi}$ . Lo observado es opuesto a lo reportados para la misma reacción en disolventes orgánicos y en  $scCO_2$ , lo que da cuenta de la interacción del agua y el TFE.
- Se observó que  $a_{wi} = 0.45$  existe una ligera cooperatividad que podría ser reflejo de la formación de dímeros de sustrato que son igualmente reconocidos por la enzima.
- Los resultados anteriores señalan al TFE líquido como un buen candidato a ser empleado como medio de reacción en la hidrólisis enzimática de diésteres

de luteína, puesto que los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos empleando hexano como medio de reacción y comparables con las de scCO<sub>2</sub>, pero a presiones de operación mucho menores. Resulta interesante que la velocidad máxima alcanzada en este fluido comprimido orgánico es tres veces mayor a la reportada en hexano.

## 7. RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

El trabajo presentado ofrece un panorama general respecto al uso de TFE como medio de reacción en la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína. Sin embargo una comprensión más profunda que permita un control eficaz del sistema requiere continuar el trabajo de investigación. En este sentido se presentan algunas propuestas que desde el punto de la vista del autora contribuyen a tal propósito.

- ✓ Debido a que el aumento  $a_{wi}$  tiene un efecto positivo, resulta importante evaluar el comportamiento del sistema en un amplio intervalo de  $a_{wi}$ .
- ✓ Es necesaria una investigación cinética avanzada para explicar la gráfica de saturación sigmoideal y corroborar la formación de dímeros de sustrato; de ser así, serían conveniente conocer bajo que condiciones es favorecido este fenómeno.
- ✓ Puesto que el agua presente en el sistema interacciona de manera importante con el TFE, es importante saber si el TFE tiene un efecto deshidratante sobre el biocatalizador tal que produzca inhibición de actividad.
- ✓ Desde el punto de vista económico resulta interesante saber si la enzima conserva actividad después de los ciclos de reacción y así determinar si el biocatalizador es susceptible a reutilizarse.
- ✓ Por otra parte es importante no perder de vista que la obtención de luteína de la flor de cempasúchil es un proceso que consta de diferentes etapas. En el presente trabajo se evaluó la hidrólisis enzimática como alternativa a la saponificación partiendo de una oleoresina rica en diésteres y no de la flor directamente. Si embargo, debido a los resultados alentadores resultaría interesante evaluar la extracción de xantofilas de la flor de cempasuchil empleando TFE líquido como disolvente de extracción e incluso en sistema cerrado de recuperación y reuso del freon.

## 8. REFERENCIAS

- Alves-Rodrigues, A. y A. Shao (2004). "The science behind lutein." Toxicol Lett **150**(1): 57-83.
- Aman, R., Biehl, J., Reinhold, C., Conrad, J., Beifuss, U., y A. Schieber (2005). "Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables." Food Chem **92**: 753-763.
- Baker, R. y C. Günther (2004). "The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption." Trends Food Sci Tech **15**: 484-488.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turleburg, J.P., Christiansen, Hüge-Lensen, B., Norskov, L., Thim, A. y U. Menge (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." Nature **343**(6260): 767-770.
- Breithaupt, D. E. (2007). "Modern application of xanthophylls in animal feeding- a review." Trends Food Sci Tech **18**: 501-506.
- Britton, G. (1983). The biochemistry of natural pigments. Gran Bretaña, Cambridge.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, C.G., Lawson, D.M., Turkenburg, F., Bjorklings, F., Hüge-Lensen, B., Patkar, S.A. y L. Thim (1991). "A model for interfacial activation in lipase from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." Nature **361**: 491-494.
- Burton, G. W. (1989). "Antioxidant action of carotenoids." J Nutr **119**: 112-115.
- Castillo Ruz, M. C. (2010). Síntesis enzimática de poli(epsilon-caprolactona-co-glicólido)s en el medio 1,1,1,2-tetrafluoretano líquido. Facultad de Química. México, UNAM. **Maestría**.
- Condra, L. W. (1993). Reliability improvement with design of experiments New York, M. Dekker.
- Corr, S. (2002). "1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent." J Fluorine Chem **118**: 55-67.
- Dordick, A. S. (1989). "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents." Enzyme Microb Tech **11**: 194-211.
- Fersht, A. (1985). Enzyme structure and mechanism. New York, W.H. Freeman and company.
- Fox, D. L. (1953). Animal biochromes and structural colours : Physical, chemical ditributional & physiological features of coloured bodies in the animal world. Cambridge, University Press.
- Frost y Sullivan (2007). Strategic analysis of the global markets for lutein in human nutrition. En internet: [http://www.researchandmarkets.com/reports/513574/strategic\\_analysis\\_of\\_the\\_global\\_markets\\_for](http://www.researchandmarkets.com/reports/513574/strategic_analysis_of_the_global_markets_for)
- Gaitonde, V., Karnok, S.R. y J.P. Davim (2008). "Taguchi multiple-performance characteristics optimization in drilling of medium density fibreboard (MDF) to minimize delamination using utility concept." J Mater Process Tech **196**: 73-78.

- García-Arrazola, R., Gimeno, M. y E. Bárzana (2007). "Use of Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as solvent media for enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of lactones." Macromolecules **40**(12): 4119-4120.
- Gimeno, M., Ramírez-Hernández, J.Y., Martínez-Ibarra C, Pacheco N, García-Arrazola R, Bárzana E. y K. Shirai (2007). "One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes." J Agr Food Chem **55**: 10345-10350.
- Gimeno, M., Ventosa, N., Sala, S. y J. Veciana (2005). "Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R-134a)-Expanded liquids as solvent media for ecoefficient particle design with the DELOS Crystallization Process." Cryst Growth Des **6**(1): 23-25.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. y W.W. Willett (1995). "Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer." J Natl Cancer Inst **87**: 1767-1776.
- González Mejía, J. C. (2006). Evaluación de disolventes en la reacción enzimática de hidrólisis de ésteres de luteína. Facultad de Química. Mexico, UNAM. **Maestría**.
- Hojnik, A., Skerget, M. y Z. Knez (2008). "Extraction of lutein from marigold flower petals- Experimental kinetic and modelling." Food Sci Technol **41**: 2008-2016.
- Jackson, K., Bowman, A.E. y J.L. Fulton (1995). "Water solubility measurements in supercritical fluids and high-pressure liquids using near-Infrared spectroscopy." Anal Chem **16**(14): 396-403.
- Jeager, A. E. y M. T. Reerz (1998). "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology." Trends Biotechnol **16**: 396-403.
- Johnson, E. J. (2002). "The role of carotenoids in human health." Nutr Clin Care **5**(2): 56-65.
- Klibanov, A. M. (1997). "Why enzymes are less active in organic solvents than in water." Trends Biotechnol **15**: 97-101.
- Klibanov, A. M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents." Nature **409**: 241-246.
- Klibanov, A. M. (2003). "Asymetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents." Curr Opin Biotech **14**: 427-431.
- Kohler, B. E. (1995). Electronic structure of carotenoids. Carotenoids. G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander. Berlin, Birkhäuser Verlag **1**.
- Krishna, S. H. (2002). "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media." Biotechnol Adv **20**: 239-267.
- Landrum, J. T. y R. A. Bone (2001). "Lutein, zeaxanthin and the macular pigment." Arch Biochem Biophys **385**(1): 28-40.
- López-Luna, A., Gallegos, J.L., Gimeno, M., Vivaldo-Lima, E. y E. Bárzana (2010). "Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media " J Mol Catal B **67**(1-2): 143-149.
- López Jiménez, C. J. (2010). Diseño de un reactor de lecho fijo para la esterificación enzimática de alcoholes pesados con ácido acético. Facultad de Química. México, UNAM. **Maestría**.
- Mesiano, A., Beckman, E.J. y A.J. Russell (1999). "Supercritical biocatalysis." Chem Rev **99**: 623-633.

- Montenegro Pereira, H. A. P. (2007). Hidrólisis enzimática de diésteres de luteína en un reactor enzimático con recirculación. Facultad de Química. México, UNAM. **Maestría**.
- Mora-Pale, J. M., Pérez-Munguía, S., González-Mejía, J.C., Dordick, J.S. y E. Bárzana (2007). "The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non-aqueous media is favored at extremely low water activities." Biotechnol Bioeng **98**(3): 535-542.
- Mora Pale, J. M. (2007). Hidrólisis enzimática de diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua. Facultad de Química. Mexico, UNAM. **Doctorado**.
- Naranjo Modad, S. (2000). Extracción de carotenoides y otros compuestos por medio de CO<sub>2</sub> en estado supercrítico a partir de *Tagetes erecta*. Facultad de Química. México, UNAM. **Doctorado**.
- Philip, T. y J. W. Berry (1976). "Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers." J Food Sci **40**(5): 1089-1090.
- Schmid, R. D. y R. Verger (1998). "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications." Angew Chem Int Edit **37**(12): 1608-1633.
- Schweigert, S. J. (1995). Metabolism of carotenoids in Mammals. Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander. Berlin, Birkhäuser Verlag. **3**.
- Sharma, Chisti, Y. y U.C. Banerjee (2001). "Production, purification characterization and application of lipases." Biotechnol Adv **19**: 627-662.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H. y T. Manolis (2004). "Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry " J Chromatogr A **1045**: 65-70.
- Wang, D. I. C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E. y M.D. Lilly Eds. (1979). Fermentation and enzyme technology. New York, Wiley and Sons.
- Yu, G., Xue, Y., Xu, W., Zhang, J. y CH. Xue (2007). "Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a)." J Ind Microbiol Biot **34**(12): 793-798.
- Zaks, A. y A. M. Klivanov (1998). "Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents." J Bioll Chem **263**(7): 3194-3201.
- Zorn, H., Breithaupt, D.E., Takenberg, M., Schwack, W. y R.G. Berger (2003). "Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by comercial lipases and *Pleurotus sapidus* estracellurat lipase." Enzyme Microb Tech **32**(623-628).



## ANEXO

## Curva de calibración de diésteres de luteína

Se construyó una curva patrón de DL (figura 13), con el objetivo de cuantificar los diésteres al inicio y al final de cada reacción, para lo cual se preparó una solución de  $0.9 \text{ mg}_{\text{oleoresina}}/\text{mL}$ , recordando que el 80% corresponde a DL. Se realizaron diluciones para cubrir las concentraciones de diésteres de luteína empleadas en los experimentos.

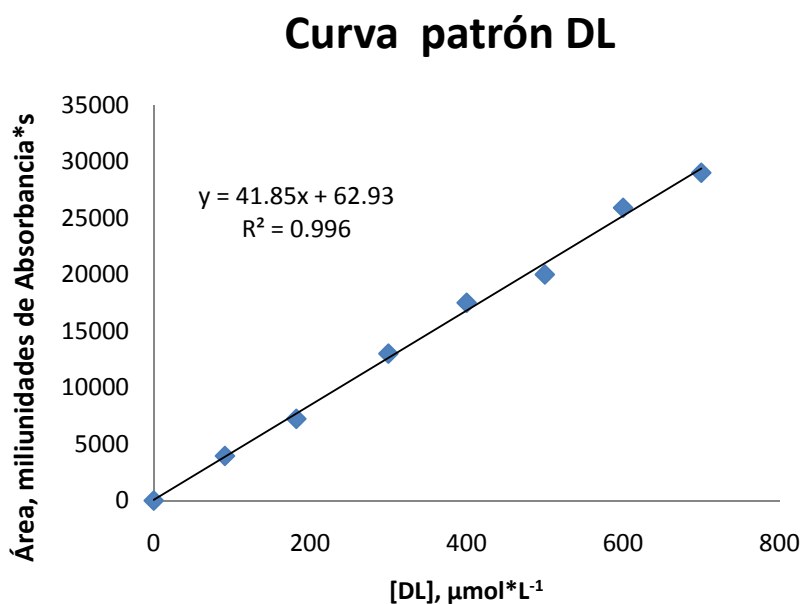


Figura 13. Curva patrón de diésteres de luteína.