

52  
2e.j.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**BIOCATALISIS EN MEDIOS  
SUPERCRTICOS**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERA QUIMICA  
P R E S E N T A  
IDA CATERINA GARCIA APPENDINI**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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:** Prof. Francisco Barnés de Castro.

**Vocal:** Prof. Jorge Ramírez Solís

**Secretario:** Prof. Eduardo Bárzana García

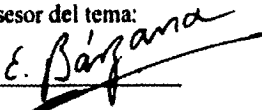
**1er Suplente:** Prof. Santiago Capella Vizcaíno

**2do Suplente:** Prof. Miguel Antonio Costas Basín

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

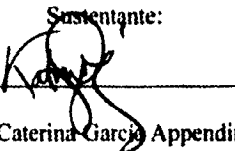
Asesor del tema:



\_\_\_\_\_

Dr. Eduardo Bárzana García.

Sustentante:



\_\_\_\_\_

Ida Caterina García Appendini

## **DEDICATORIAS**

**A mis papás, a Marieni y Justo por los días tan felices que he pasado en su compañía.  
Les debo tanto.....**

**A Lalo.....**

**A mi familia**

**A mis amigos**

**A Adela Castillejos**

## **DEDICATORIAS**

**A mis papás, a Mariem y Justo por los días tan felices que he pasado en su compañía.  
Les debo tanto.....**

**A Lalo.....**

**A mi familia**

**A mis amigos**

**A Adela Castillejos**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Eduardo Bérzana por su apoyo al realizar este trabajo.**

**A Lalo por la ayuda incondicional que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.  
Gracias por Todo.**

**A Manuel, por sus ideas y comentarios.**

**A la UNAM, y en especial a la Facultad de Química, a quien debo enteramente mi  
formación profesional.**

**A todos mis maestros que de alguna manera u otra han contribuido en mi aprendizaje.**

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....		<b>1</b>
<b>CAPITULO 1. EL FENOMENO SUPERCRITICO</b> .....		<b>4</b>
1.1 Generalidades.....		5
1.2 Propiedades de los FSC.....		10
<b>CAPITULO 2. DESARROLLO HISTORICO DE LOS FSC</b> .....		<b>16</b>
<b>CAPITULO 3. USOS INDUSTRIALES DE LOS FSC</b> .....		<b>21</b>
3.1 Industria Química.....		23
3.2 Industria Alimentaria.....		26
3.3 Industria Farmacéutica.....		28
3.4 Mejoramiento del Ambiente.....		28
<b>CAPITULO 4. BIOCATALISIS EN MEDIOS SUPERCRITICOS</b> .....		<b>30</b>
4.1 Generalidades. Las Enzimas.....		31
4.2 Biocatálisis en Medios Orgánicos.....		35
4.3 Biocatálisis en Medios Supercríticos.....		38
<b>CAPITULO 5. COMPORTAMIENTO TERMODINAMICO DEL SISTEMA CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O</b> .....		<b>52</b>
5.1 Importancia del Agua en la Enzima.....		53
5.2 Contenido de Agua en la Enzima.....		54
5.3 Contenido de Agua en el CO <sub>2</sub> SC.....		55
<b>CAPITULO 6. COMENTARIOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....		<b>62</b>
<b>CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA</b> .....		<b>67</b>

## **INTRODUCCION**



## **INTRODUCCIÓN**

El descubrimiento de los fluidos supercríticos data de 1879 cuando Hannay y Hogarth reportaron la capacidad de ciertos gases a altas presiones para solubilizar materiales sólidos de baja presión de vapor, por encima de su punto crítico.

Actualmente, el término de fluido supercrítico (FSC) se refiere a las condiciones que adopta una sustancia después de pasar por su punto crítico. Es decir, el punto correspondiente a la temperatura y presión más altas para que coexista el equilibrio líquido-vapor de la sustancia.

Las propiedades de los FSC son intermedias entre las de un líquido y un vapor. La difusividad, por citar un ejemplo, es mucho mayor a la de los líquidos y cercana a los valores reportados por los vapores; esto implica una gran capacidad de penetración al soluto, mayor a la de los líquidos. Sin embargo, el mayor atractivo que presentan los FSC es quizá la relación que existe entre su poder como disolvente y su densidad, pues basta con variar mínimamente la segunda (al modificar T y/o P) para obtener cambios drásticos en la solubilidad de la sustancia en el fluido. De aquí derivó la idea de sustituir a los disolventes orgánicos tradicionales por FSC ya que, al ofrecer un rango muy amplio de solubilidades, podrían intervenir en procesos extractivos de alta selectividad.

Los fluidos supercríticos han sido utilizados recientemente a nivel industrial, principalmente en procesos de extracción como lo es la extracción de la cafeína del café y la de combustibles líquidos del carbón. Actualmente, la tecnología supercrítica ha cobrado mayor importancia en el mejoramiento del medio ambiente como resultado de la creciente preocupación ecológica a nivel mundial. Un ejemplo de esto es la remediación de suelos por remoción de contaminantes orgánicos provenientes de materiales sólidos. Por este motivo, el uso de los FSC es prometedor debido a las cada vez más estrictas normas ambientales que limitan a los disolventes tradicionales (de hecho, la EPA ha

decretado una reducción del 50% en 17 químicos, de los cuales 5 son utilizados como disolventes en procesos extractivos).

El campo de estudio FSC ha crecido enormemente en los últimos años y repercute en varios sectores como lo son el farmacéutico (obtención de productos de alta pureza), químico (fraccionamiento de polímeros, purificación de monómeros), alimentario (extracción de aceites naturales con dióxido de carbono supercrítico, CO<sub>2</sub>SC) y en el biotecnológico.

Dentro de la biotecnología, el interés por este tipo de fluidos surgió como resultado de la experimentación con enzimas, también llamadas biocatalizadores, cuya actividad es evidente en medios orgánicos. Esto último es relativamente nuevo ya que se pensaba que las enzimas solo eran activas en medios acuosos, entorno en el cual se encuentran en la naturaleza. Gracias a este descubrimiento, se comenzaron a realizar reacciones enzimáticas en diversos FSC, debido a la similitud de éstos con los disolventes orgánicos.

Dentro de los problemas que se han suscitado al experimentar con biocatalizadores en FSC, se encuentra la determinación del contenido óptimo de humedad en el microambiente enzimático así como el agua requerida (indispensable) en el disolvente o medio de reacción para que la actividad de la enzima sea máxima. Hasta la fecha, no se ha podido precisar con claridad el porcentaje ideal de humedad requerido, pues se encuentra en función del sistema reaccionante que se estudie así como de la enzima cuya actividad es evaluada.

El objetivo primordial de este trabajo consistió en elaborar una recopilación exhaustiva de todo lo relacionado a la cronología, evolución, importancia y aplicaciones de la tecnología supercrítica con el fin de tener una visión más clara, rápida e inmediata de lo que es el fenómeno SC en sí, de los obstáculos que se han presentado y de las conclusiones a las que se ha llegado. Esto permitirá a los interesados en la materia, dar un seguimiento a las investigaciones.

**CAPITULO 1**

**EL FENOMENO SUPERCRITICO**

## EL FENÓMENO SUPERCRÍTICO

### 1.1 Generalidades

El término "fluido supercrítico" (FSC) se conoce desde hace más de cien años y es aplicable a gases condensables; sin embargo, la aplicación de éstos es relativamente reciente (última década).

Una sustancia alcanza condiciones supercríticas cuando se encuentra sometida a presiones y temperaturas superiores a las críticas. El comportamiento de una sustancia pura puede representarse gráficamente en un diagrama de fases P-T:

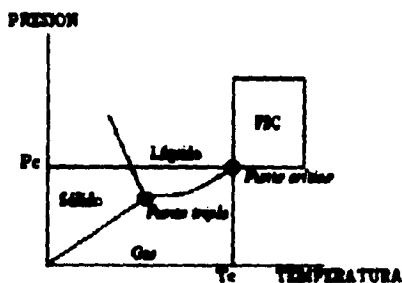


Figura 1.1

La temperatura crítica de una sustancia,  $T_c$ , se define como la máxima temperatura a la cual un gas puede convertirse en líquido al aumentarse la presión del sistema. Asimismo, la presión crítica,  $P_c$ , es la máxima presión a la que un líquido puede convertirse en gas al aumentarse la temperatura. En otras palabras, el punto crítico ( $T_c, P_c$ ), se refiere a la temperatura y presión más altas a las que puede existir una sustancia en equilibrio líquido-vapor.

Como se puede observar en la siguiente tabla, cada sustancia posee diferentes condiciones críticas. Esto se debe a la polaridad y al tipo de enlace entre las moléculas que las componen.

Sustancia	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (atm)
CO <sub>2</sub>	31.1	72.8
etano	32.3	48.2
etileno	9.3	49.7
propano	96.7	41.9
propileno	91.9	45.6
ciclohexano	280.3	40.2
isopropanol	235.2	47.0

Sustancia	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (atm)
benceno	289.0	48.3
tolueno	318.6	40.6
p-xileno	343.1	34.7
clorotrifluorometano	28.9	38.7
triclorofluorometano	198.1	43.5
amoníaco	132.5	111.3
agua	374.2	217.6

Tabla 1  
Condiciones Críticas para Varios Disolventes SC (Mc.Hugh, Krutonis, 1986).

Al estudiar los diferentes compuestos sometidos a condiciones supercríticas, los científicos se han percatado de que en un FSC existe una estrecha relación entre el poder solvatante de dicho fluido y la densidad que éste presenta en la región crítica de la sustancia. Esta particularidad es la que les confiere un gran atractivo a los FSC y puede representarse al graficar la presión reducida,  $P_R$ , (donde  $P_R = P/P_c$ ) vs. la densidad reducida de un componente puro,  $\rho_R$ , (en donde  $\rho_R = \rho/\rho_c$ ) a diferentes isotermas de  $T_R$  ( $T_R = T/T_c$ ). Ver Figura 1.2.

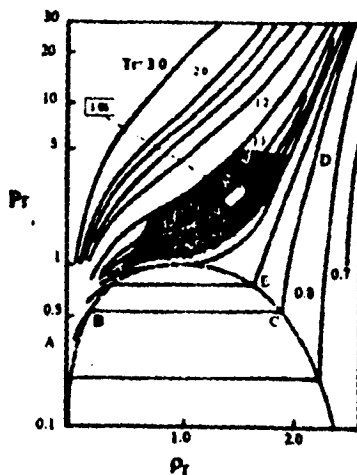
Como se puede observar en la siguiente tabla, cada sustancia posee diferentes condiciones críticas. Esto se debe a la polaridad y al tipo de enlace entre las moléculas que las componen.

Sustancia	Tc (°C)	Pc (atm)
CO <sub>2</sub>	31.1	72.8
etano	32.3	48.2
etileno	9.3	49.7
propano	96.7	41.9
propileno	91.9	45.6
ciclohexano	280.3	40.2
isopropanol	235.2	47.0

Sustancia	Tc (°C)	Pc (atm)
benceno	289.0	48.3
tolueno	318.6	40.6
p-xileno	343.1	34.7
clorotrifluorometano	28.9	38.7
triclorofluorometano	198.1	43.5
amoníaco	132.5	111.3
agua	374.2	217.6

**Tabla 1**  
Condiciones Críticas para Varios Disolventes SC (Mc.Hugh, Kratonis, 1986).

Al estudiar los diferentes compuestos sometidos a condiciones supercríticas, los científicos se han percatado de que en un FSC existe una estrecha relación entre el poder solventante de dicho fluido y la densidad que éste presenta en la región crítica de la sustancia. Esta particularidad es la que les confiere un gran atractivo a los FSC y puede representarse al graficar la presión reducida,  $P_R$ , (donde  $P_R = P/P_C$ ) vs. la densidad reducida de un componente puro,  $\rho_R$ , (en donde  $\rho_R = \rho/\rho_c$ ) a diferentes isotermas de  $T_R$  ( $T_R = T/T_c$ ). Ver Figura 1.2.



Figural.2

Isotermas presión-densidad para CO<sub>2</sub> (Ponce y Treviño,1989).

De esta gráfica se puede inferir que si un vapor de CO<sub>2</sub> (a una T donde  $T < T_c$  y, por lo tanto  $T_R < 1$ ) es comprimido isotérmicamente a partir del punto A, llegará un momento en el que aparezca la primera gota de líquido (B). Posteriormente, al ir aumentando la cantidad de líquido (B-C) en la mezcla, se llega al punto C en donde desaparece la última burbuja de vapor. A partir de este momento se tendrá CO<sub>2</sub> líquido y la curva C-D representará la compresión del CO<sub>2</sub> líquido.

Si se buscan densidades similares a las del líquido cerca del punto crítico, a temperaturas poco mayores a  $T_c$  y en la región cercana a  $P_c$ , se necesita variar mínimamente la presión para obtener grandes cambios en la densidad.

Para temperaturas donde  $T \gg T_c$  se necesitan variaciones importantes en la presión para obtener densidades similares a las del  $\text{CO}_2$  líquido.

Como se sabe que a mayores densidades mejora de manera importante el poder disolvente, los experimentos con  $\text{CO}_2$  SC se realizan en la región supercrítica sombreada cercana al punto crítico de dicho compuesto.

Por lo anterior se puede decir que el gran atractivo que presentan los FSC es la gran sensibilidad que tienen para variar su densidad ( y por consiguiente el poder disolvente) al modificar mínimamente variables como T y P. Esta particularidad les confiere a los FSC la posibilidad de sustituir a los disolventes orgánicos cuyo uso está siendo cada vez más limitado por consideraciones ecológicas y toxicológicas.

La variación en la capacidad disolvente de un FSC puede apreciarse en la Figura 1.3 en donde se esquematiza la solubilidad del naftaleno en etileno SC ( $T_c=9.3^\circ\text{C}$ ,  $P_c=49.8 \text{ atm}$ ).

A la T de  $12^\circ\text{C}$  ( $T_r=1.01$ ) y a presiones menores a 50 atm, la solubilidad del naftaleno sólido en etileno SC es casi nula (esto es equiparable a la baja solubilidad de un sólido en un gas). Sin embargo, al aumentar la P de 50 a 90 atm se aprecia un aumento notable en la solubilidad. Al seguir incrementando la P a partir de 90 atm, la solubilidad aumenta lentamente con la P hasta alcanzar un límite cercano a la solubilización del 1.5% mol. Si se compara la forma de la isoterma @  $12^\circ\text{C}$  de la Figura 1.3 con la de la Figura 1.4 (@ $T_r = 1$ ), se observa que ambas siguen la misma tendencia. Esto último explica claramente la relación que existe entre la capacidad disolvente de un FSC y el comportamiento de la densidad del disolvente en la región crítica.

Por otro lado, al considerar la isoterma @  $35^\circ\text{C}$  de la Figura 1.3, se observa que aunque la variación de la solubilidad en la región cercana a las 50 atm no es tan evidente como en el caso anterior, se llega a un valor de solubilidad límite cercano al 5% mol, valor que se obtiene a presiones mayores a 100 atm donde el etileno exhibe densidades parecidas a las del líquido.



Para temperaturas donde  $T \gg T_c$  se necesitan variaciones importantes en la presión para obtener densidades similares a las del  $\text{CO}_2$  líquido.

Como se sabe que a mayores densidades mejora de manera importante el poder disolvente, los experimentos con  $\text{CO}_2$  SC se realizan en la región supercrítica sombreada cercana al punto crítico de dicho compuesto.

Por lo anterior se puede decir que el gran atractivo que presentan los FSC es la gran sensibilidad que tienen para variar su densidad ( y por consiguiente el poder disolvente) al modificar mínimamente variables como T y P. Esta particularidad les confiere a los FSC la posibilidad de sustituir a los disolventes orgánicos cuyo uso está siendo cada vez más limitado por consideraciones ecológicas y toxicológicas.

La variación en la capacidad disolvente de un FSC puede apreciarse en la Figura 1.3 en donde se esquematiza la solubilidad del naftaleno en etileno SC ( $T_c=9.3^\circ\text{C}$ ,  $P_c=49.8$  atm).

A la T de  $12^\circ\text{C}$  ( $T_R=1.01$ ) y a presiones menores a 50 atm, la solubilidad del naftaleno sólido en etileno SC es casi nula (esto es equiparable a la baja solubilidad de un sólido en un gas). Sin embargo, al aumentar la P de 50 a 90 atm se aprecia un aumento notable en la solubilidad. Al seguir incrementando la P a partir de 90 atm, la solubilidad aumenta lentamente con la P hasta alcanzar un límite cercano a la solubilización del 1.5% mol. Si se compara la forma de la isoterma @  $12^\circ\text{C}$  de la Figura 1.3 con la de la Figura 1.4 (@ $T_R = 1$ ), se observa que ambas siguen la misma tendencia. Esto último explica claramente la relación que existe entre la capacidad disolvente de un FSC y el comportamiento de la densidad del disolvente en la región crítica.

Por otro lado, al considerar la isoterma @  $35^\circ\text{C}$  de la Figura 1.3, se observa que aunque la variación de la solubilidad en la región cercana a las 50 atm no es tan evidente como en el caso anterior, se llega a un valor de solubilidad límite cercano al 5% mol, valor que se obtiene a presiones mayores a 100 atm donde el etileno exhibe densidades parecidas a las del líquido.

La diferencia en solubilidades entre isoterma a presiones superiores a 150 atm se debe al aumento en la presión de sublimación del naftaleno como resultado del calentamiento de éste de 12 a 35°C dado que, como puede observarse en la Figura 1.4, la diferencia en densidades entre la isoterma de 12°C ( $T_R = 1.01$ ) y la de 35°C ( $T_R = 1.09$ ) no es muy grande.

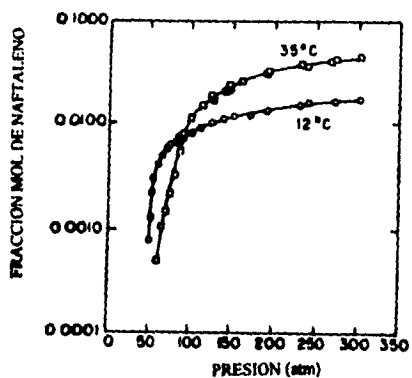


Figura 1.3

Solubilidad del naftaleno sólido en etilenoSC (McHugh, Krukonis, 1986)

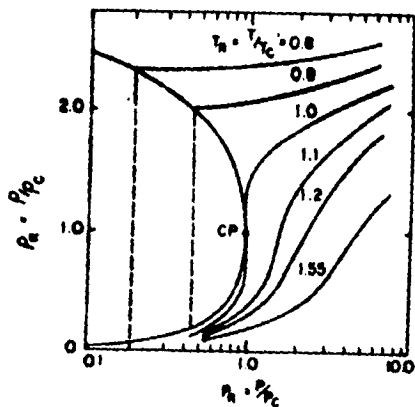


Figura 1.4

Variación de la  $p_R$  de un componente puro cerca del punto crítico (McHugh, Krukonis, 1986)

Otro método para ajustar el poder disolvente de un FSC (para solubilizar compuestos más polares, por ejemplo), consiste en añadir cosolventes o sustancias que modifican la polaridad de la mezcla supercrítica tales como etanol, metanol y acetona (Page et al., 1992). Aunque el  $\text{CO}_2$ , por ejemplo, tenga un poder solvatante bastante bueno gracias a su configuración molecular (base de Lewis cuyo dipolo inducido ácido/base le permite solvatar una gran cantidad de sustancias), no es suficiente como para disolver compuestos de alto peso molecular o analitos polares cuya disolución requiere de un importante número de interacciones por parte del disolvente. Al añadir cosolventes, esto último es posible. Sin embargo, el uso de estos modificadores es limitado ya que generalmente no se cuenta con diagramas de fase P-T que permitan conocer con exactitud la variación en los puntos críticos de la mezcla según la cantidad de cosolvente añadida. Además, por lo general, los cosolventes dejan residuos dado que usualmente son líquidos a temperatura y presión ambiente. Por el contrario, los FSC se evaporan a condiciones ambientales y, por lo tanto, no dejan residuos.

## **1.2 Propiedades de los FSC**

Además del atractivo industrial que presentan los fluidos supercríticos como disolventes (pueden sustituir a los disolventes orgánicos), éstos poseen características fisicoquímicas peculiares que les confieren aún más probabilidades de ser empleados en un sinnúmero de procesos químicos.

Al analizar los valores de densidad, coeficiente de difusión, viscosidad y tensión superficial de los FSC se encuentra que éstos son generalmente intermedios entre los de un líquido y un vapor. Lo anterior puede observarse en la Tabla 2.

Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	(0.6-2.0)x10 <sup>-3</sup>	0.2-0.9	0.6-1.6
Coefficiente de Difusión (cm <sup>2</sup> /s)	0.1-0.4	(0.2-0.7)x10 <sup>3</sup>	(0.2-2.0)x10 <sup>-5</sup>
Viscosidad (g/cm s)	(1-3)x10 <sup>-4</sup>	(1-9)x10 <sup>-4</sup>	(0.2-3.0)x10 <sup>-2</sup>
Tensión Superficial (dinas)	0	0	finito

Tabla 2  
(Ponce y Treviño, 1989).

La densidad, muy parecida a la de los líquidos, es ya de por sí (sin variarla) representativa de un poder disolvente relativamente alto.

La difusividad, mucho mayor a la de los líquidos (ver Figura 1.5) confiere a los FSC una gran capacidad de penetración al soluto así como una reducción de limitaciones por transferencia de masa, sobre todo interna.

La tensión superficial, casi nula, permite una mayor penetración (sobre todo en poros pequeños, inaccesibles a los líquidos) debido a un buen "mojado" de solutos sólidos. La viscosidad de un FSC es menor a la de los líquidos, lo que trae como resultado un mejor mezclado que se traduce en niveles altos de transferencia de masa externa (Figura 1.6). Como se puede observar, tanto la difusividad como la viscosidad aumentan rápidamente según se adentra en la región crítica. Es importante notar que la viscosidad se mantiene abajo de los valores para líquidos aún a presiones cercanas a las 1000 atm.

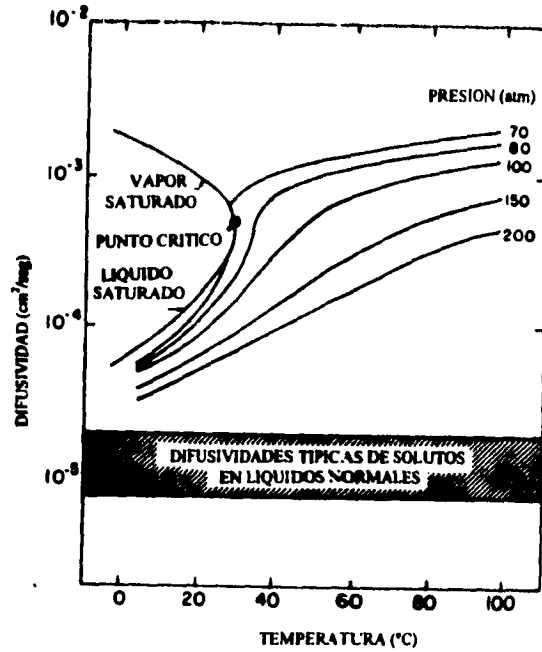


Figura 1.5 Difusividad del CO<sub>2</sub>SC  
(McHugh, Krukonia, 1986).

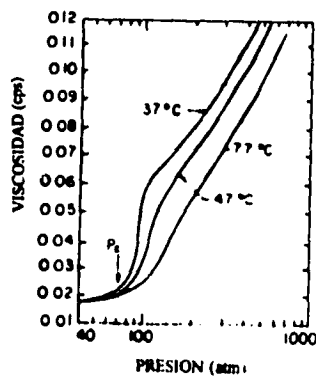


Figura 1.6  
Viscosidad del CO<sub>2</sub>SC.  
(McHugh, Krukonia, 1986).

El hecho de que la transferencia de masa sea más rápida en un FSC que en un líquido se debe a las altas difusividades reportadas por los primeros. Sin embargo, la mayor difusividad no siempre se traduce en una ventaja (Randolph,1990) pues muchas reacciones están limitadas por cuestiones de equilibrio más que por efectos difusionales. En estos casos, la velocidad de transferencia de masa puede incrementarse con la ayuda de la convección natural (inducida por fluctuaciones en la densidad supercrítica). Esta se encuentra en función del número de Graahof, Gr, y la transferencia de masa total está relacionada con el número de Sherwood, Sh, ( $Sh = f(Re, SC, Gr)$ ). Sh es un número adimensional utilizado para correlacionar el coeficiente de transferencia de masa, Kc. En el caso de los FSC, Gr tiene un valor muy alto cerca del punto crítico (del orden de  $3 \times 10^7$ ) debido a la baja viscosidad cinemática y a la dependencia de la solubilidad en la concentración presentes en esta región. Lim et al. (citado por Randolph,1990) han podido reportar, entonces, un valor máximo en el coeficiente de transferencia de masa cerca del punto crítico al correlacionarlo con un valor máximo del Gr, llegando a la siguiente expresión:

$$\frac{Sh}{(ScGr)^{1/4}} = 1.692 \left( \frac{Re}{Gr^{1/2}} \right)^{0.356} \text{ donde:}$$

$Re = \rho d_p v \mu^{-1}$	Re = número de Reynolds
	$\rho$ = densidad
	$d_p$ = diámetro de partícula
$Sc = \mu \rho^{-1} D^{-1}$	$v$ = velocidad superficial
	$\mu$ = viscosidad
$Sh = Kc d_p D^{-1}$	Sc = número de Schmidt
	D = difusividad molecular

Debido al favorable conjunto de propiedades con que cuenta un FSC y después de someterlos a numerosas investigaciones, se ha llegado a afirmar que éstos pueden reemplazar -en varios casos- a los disolventes orgánicos, con la ventaja de que la mayoría de los FSC prometen una fácil separación (al variar solamente la T y la P) y una alta recuperación de los productos (sin residuos de disolvente) en cualquier proceso extractivo y que incluso pueden intervenir en reacciones químicas generando a veces mayores rendimientos.

Si bien lo anterior es plausible, el uso de FSC no se ha consolidado debido al alto costo del equipo industrial que se requiere para lograr presiones altas y a una cierta falta de conocimientos fundamentales acerca de estos fluidos. Sin embargo, existen en la actualidad diversos procesos tales como la extracción de oleoresinas, pigmentos, productos naturales, esencias, carbón, etc., que ya emplean FSC. Inclusive, después de que la biotecnología ha ampliado su campo de acción al comprobar que las enzimas - o biocatalizadores - pueden actuar en medios orgánicos, (cuestión poco creíble hace algunos años pues se asumía que solo lo hacían en medios acuosos, entorno en el cual se encuentran en la naturaleza), ha surgido el interés por sustituir los disolventes orgánicos por FSC que en algunos casos (como el  $\text{CO}_2$ ) han probado ser inocuos (i.e. no tóxicos), de menor impacto ambiental y adecuados al trabajar con material biológico termolábil como resultado de las bajas temperaturas críticas para estos gases (menores a  $35^\circ\text{C}$ ).



**CAPITULO 2**

**DESARROLLO HISTORICO DE LOS FSC**

## **DESARROLLO HISTÓRICO DE LOS FSC**

En 1879, Hannay y Hogarth reportaron, por primera vez, y no sin causar controversias, la habilidad de los FSC para disolver materiales sólidos de baja presión de vapor (McHugh, Krukonis, 1986). Usando tubos de vidrio de poco diámetro, observaron que a temperaturas superiores a la  $T_c$  del etanol ( $234^\circ\text{C}$ ), diversas sales (p.ej.  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{KBr}$  y  $\text{KI}$ ) se disolvían en etanol (si se aumentaba la presión del sistema) o precipitaban en forma de "nieve" si se disminuía la presión.

Los experimentos de Hannay y Hogarth, sin embargo, no fueron los primeros; en 1822 el Barón Cagniard de la Tour descubrió el punto crítico de una sustancia. De hecho, por muchos años se refirió al punto crítico como el punto de Cagniard de la Tour. Para realizar experimentos a altas presiones, este investigador utilizó un pedazo de tubo en el cual introdujo una pelotita de pedernal. Selló el tubo y empezó a calentarlo. Conforme aumentaba la temperatura Cagniard de la Tour movía ligeramente el tubo para escuchar cambios en el sonido de la pelotita. Estas variaciones en el sonido lo llevaron a descubrir más tarde el punto crítico. Posteriormente efectuó experimentos en tubos de vidrio para observar visualmente el fenómeno crítico.

El  $\text{CO}_2$  SC cobró auge en la segunda mitad del siglo XIX. El Doctor Thomas Andrews, Vicepresidente del Queen's College en Belfast, Irlanda, llevó a cabo experimentos con este compuesto buscando estudiar su comportamiento termodinámico. Los valores de  $T_c$  y  $P_c$  reportados por Andrews son bastante similares a los conocidos actualmente.

En 1879, Amagat describió un método para comprimir gases a una presión de hasta 400 atm usando columnas de Hg que llegaban hasta el tiro de una mina. Doce años más tarde, Caillottet logró generar altas presiones con columnas de Hg de la altura de la Torre Eiffel. Aunque se recurrió mucho a este tipo de experimentos para lograr altas presiones, no faltaron los problemas como el tan frecuente rompimiento de los tubos de acero.

Aunque Hannay y Hogarth demostraron la relación de la presión con la solubilidad utilizando sales inorgánicas, experimentos posteriores en distintos FSC ( $\text{CO}_2$ , óxido nitroso e hidrocarburos ligeros) concluyeron que solutos orgánicos líquidos y sólidos (compuestos alifáticos, aromáticos, triglicéridos, etc.) presentan el mismo comportamiento.

En 1896 Villard publicó un reporte en donde describe la habilidad del metano, del etileno, del  $\text{CO}_2$  y del óxido nitroso para disolver sustancias sólidas o líquidas como  $\text{CS}_2$ , alcañfor, ácido esteárico y cera. Gracias a sus experimentos salió a la luz por primera vez el entonces extraño fenómeno que consiste en el abatimiento del punto de fusión normal de un sólido puro debido a su interacción con un gas a altas presiones.

#### *Estudios de solubilidad del naftaleno en diversos solventes*

La solubilidad del sistema naftaleno - etileno fue el primero en estudiarse; de éste derivaron las determinaciones de solubilidad en sistemas tales como el de naftaleno en  $\text{CO}_2$  (Bächner), y el de naftaleno en etano SC y en  $\text{CO}_2$  SC (Prins, 1915). Este último encontró las curvas delimitantes entre los tres estados físicos que presentan los sistemas y los puntos críticos de las mezclas naftaleno - etano y naftaleno -  $\text{CO}_2$ .

El ritmo de investigación disminuyó notablemente hasta que a finales de la década de los cuarentas, el Profesor Scheffer y colaboradores de la Universidad de Delft iniciaron un estudio de la solubilidad y comportamiento de fases del sistema naftaleno- etileno SC.

A principios de la década de los sesentas, Tschernakaya, Iomtev y Mushkina (citados por McHugh, Krukonis, 1986) lograron medir la solubilidad del naftaleno en etileno SC y CO<sub>2</sub> SC. Posteriormente, diversos investigadores determinaron la solubilidad del naftaleno en trifluorometano, xenón, etc.

A raíz de los múltiples estudios sobre la solubilidad del naftaleno en los diversos disolventes SC se ha generado un inmenso número de datos sobre el comportamiento de fases de los diferentes sistemas.

Un investigador que contribuyó mucho al desarrollo de los FSC fue A.W. Francis quien presentó en 1954 un estudio cuantitativo de las propiedades disolventes del CO<sub>2</sub> líquido. Interesado inicialmente por el comportamiento de sistemas ternarios con CO<sub>2</sub> líquido, recolectó los datos necesarios para construir 464 diagramas de fase y pudo determinar también la solubilidad de 261 compuestos orgánicos (alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, etc.) Gracias a su colección de datos es posible generar varias reglas de solubilidad de compuestos en CO<sub>2</sub>. Aunque sus experimentos utilizan CO<sub>2</sub> líquido, los datos de Francis son aplicables, generalmente, al CO<sub>2</sub> SC.

En las últimas décadas se han estudiado diversos sistemas con disolventes SC. Tal es el caso de los sistemas sílica - H<sub>2</sub>O SC, fenantreno - ácido benzoico, etc.

Debido a lo expuesto en este capítulo y en el anterior, se puede concluir que el fenómeno de la solubilidad se conoce desde hace más de un siglo. Sin embargo, la

aplicación de éstos no está totalmente consolidada (aunque en la actualidad existen procesos que ya involucran FSC, tema del siguiente capítulo).

Las limitantes a la implementación de procesos utilizando FSC se debe principalmente a dos factores:

- a) En las primeras tres cuartas partes del siglo XX la energía era barata, fenómeno por el cual no había interés por la creación de sistemas energéticamente eficientes. No fue sino hasta la década de los setentas que se empezó a tomar conciencia del uso óptimo de la energía.
- b) El desarrollo de procesos que contemplan altas presiones depende directamente de la información termodinámica (diagramas de fase) existente. Esta última a veces no se encuentra disponible ya que, generalmente, el estudio del comportamiento termodinámico de los sistemas no se enfoca a altas presiones.

**CAPITULO 3**

**USOS INDUSTRIALES DE LOS FSC**

## USOS INDUSTRIALES DE LOS FSC

El desarrollo de los FSC a nivel industrial ha tenido grandes avances a partir de 1980. Uno de los primeros usos de los FSC, particularmente del CO<sub>2</sub>, fue en cromatografía donde se aplicaba la tecnología existente para separar mezclas no volátiles. Sin embargo, recientemente, la extracción con FSC se ha generalizado a tal grado que se han creado una serie de procesos extractivos de considerable magnitud.

De hecho, actualmente la EPA y la FDA desarrollan métodos de preparación de mezclas líquidas con base en FSC que reducirían en gran medida el consumo de disolventes así como el tiempo de análisis y la contaminación por disolventes.

Aunque las propiedades disolventes de los FSC se aplicaron originalmente a procesos extractivos, es de suma importancia mencionar que debido al interés por estas sustancias se han diseñado procesos en los cuales el FSC interviene en reacciones químicas además de actuar como disolvente. De hecho, actualmente existen varios ejemplos de reacciones en FSC (deshidratación de alcoholes con o sin catalizador; oxidaciones, pirólisis, etc.) cuya factibilidad depende principalmente de los efectos del disolvente (presión mecánica, limitaciones difusionales, efectos electrostáticos, etc.)

A mediados de la década de los ochentas, ante el creciente interés por la tecnología SC, los científicos fijaron su atención en una nueva posibilidad: el llevar a cabo reacciones biocatalíticas en FSC.

Como puede verse, el estudio de los FSC y su probable aplicación en un gran número de procesos industriales se ha ido ampliando con el paso de los años y hoy en día sigue desarrollándose. En sí, la tecnología de los FSC es tan prometedora que se ha convertido en un campo interdisciplinario atractivo a ingenieros químicos, químicos analíticos, tecnólogos de alimentos, agrónomos, biotecnólogos, farmacéuticos y científicos dedicados al control ambiental. Además, el desplazamiento de disolventes orgánicos por FSC se ha incrementado debido a las restricciones ambientales que ha decretado la EPA para los próximos años como por ejemplo, 50% de reducción en 17 químicos, de los cuales 5 son de utilización en procesos extractivos para 1995 y el 100% de reducción en la producción de clorofluorocarbono e hidroc fluorocarbono para 1996 (Via, Taylor, 1993).

A continuación se mencionarán los procesos que involucran FSC en las diferentes industrias.

### **3.1 Industria Química**

#### **3.1.1 Polimerización del etileno a altas presiones (McHugh, Krukonis, 1986).**

Este proceso es uno de los más antiguos que se conocen; fue desarrollado a finales de los 30's y su característica principal es que el disolvente actúa como reactante, además de cumplir con su papel de disolvente.

El etileno se comprime a una P de 40,000 psia y se alimenta a un reactor tubular junto con un iniciador de polimerización (oxígeno o peróxido). El polímero formado



permanece disuelto en el etileno SC a una T de operación de 250°C. Posteriormente, la solución de polietileno - etileno se expande a una P de alrededor de 5,000 psia. Al reducir la P el poder solvante del etileno es cada vez más débil por lo que el polietileno precipita para ser recolectado en un separador. El etileno sobrante es recirculado para posteriormente ser recomprimido y vuelto a utilizar.

### 3.1.2 Fraccionamiento de polímeros (McHugh, Krukonis, 1986).

Existen más de dos millones de patentes referentes a este tipo de proceso que tiene su origen en los años cuarenta. El primero en desarrollarse fue el del polietileno. Sin embargo, hoy en día existen muchos procesos de esta naturaleza tales como polipropileno, polibuteno, nylon 6, etc.

El fraccionamiento de un polímero en un medio SC se lleva a cabo en un sistema de reducción de presión secuencial.

### 3.1.3 Purificación de monómeros (McHugh, Krukonis, 1986).

La utilización de monómeros exige una alta pureza que no siempre es alcanzada en una destilación ya que estos compuestos son muy sensibles a la temperatura. El uso de CO<sub>2</sub> SC es una alternativa para la obtención de estos monómeros con la ventaja de que su Tc es de 31°C, T a la cual no sufren deterioro. Dichos monómeros sirven para fabricar lentes de contacto blandos, polímeros dentales, etc.

### **3.1.4 Extracción de combustibles líquidos del carbón (McHugh, Krukonia, 1986).**

Quando el carbón es sometido a temperaturas superiores a 400°C, la destilación de combustibles líquidos no es óptima ya que éstos son generalmente no volátiles a esta T. Si se aumenta la temperatura en la destilación, estas sustancias polimerizan formando moléculas más pesadas y solo una pequeña parte del carbón destila como alquitrán.

Una alternativa a la destilación del carbón es la extracción con FSC (generalmente tolueno) que ofrece una mayor recuperación de los líquidos y evita también las reacciones de descomposición indeseables. El uso de los FSC en procesos extractivos del carbón fue iniciado en el NCB (National Coal Board) en Gran Bretaña. Sin embargo, actualmente la extracción del carbón por FSC sigue siendo investigada y perfeccionada pues aún no se conocen con exactitud las características químicas y/o físicas del disolvente o la composición de la mezcla disolvente ideal como para obtener un mayor rendimiento y calidad máxima.

A medida que la industria química se desarrolla se generan cada vez más procesos que involucran FSC. Tal es el caso de la extracción de parafinas, oleoresinas, el desulfato del petróleo, etc.

### **3.2 Industria Alimentaria**

A la fecha existe una gran acumulación de datos experimentales relativos a la solubilidad y/o extractabilidad de diversos productos naturales (esteroides, alcaloides, aceites esenciales, fragancias, cafeína, etc.) con CO<sub>2</sub> SC, etano SC y N<sub>2</sub>O SC. De éstos, el CO<sub>2</sub> ha sido el más utilizado ya que su Tc (31.1°C) es ideal para extraer o solubilizar sustancias termolábiles. Además, este disolvente ofrece varias ventajas sobre los otros: baja toxicidad, baja corrosividad, baja flammabilidad, precio razonable, alta pureza e impacto ambiental moderado.

La extracción de cafeína del café y la extracción del lúpulo con CO<sub>2</sub> SC son los procesos de esta naturaleza más importantes de la industria alimentaria. Ambos se emplean a escala comercial (Alemania procesa 60 millones lb/año de café) y han tenido éxito en nichos de mercado específicos como el de las especialidades alimenticias.

#### **3.2.1 Extracción de la cafeína del café (McHugh, Krutonis, 1986).**

Los estudios relativos a este proceso se iniciaron en Alemania en la década de los setentas. Posteriormente, E.E.U.U. desarrolló otras modalidades, dando como resultado un gran número de patentes que a la fecha sigue incrementándose (extracción de estimulantes del té, cacao y café)

En el proceso general, los granos del café se humidifican (pues se ha observado que el CO<sub>2</sub> SC no solubiliza a la cafeína del café seco) y se expone al CO<sub>2</sub> (T=45°C, P=300 atm) que se encuentra en exceso debido a que la cafeína no es muy soluble en él.

Dicho disolvente circula a través de un lecho empacado durante 5 horas. Posteriormente, el agua es separada en su totalidad de la cafeína cuando la P es reducida a 60 atm y la T a 22°C. El contenido inicial de cafeína en el café (generalmente 1.25% peso) es reducido a un valor de 0.06% transcurrido el proceso. Para perfeccionar el proceso se han realizado diversos estudios de solubilidad en el sistema CO<sub>2</sub>-agua-cafeína-café.

### 3.2.2 Extracción de lúpulo (McHugh, Krukonis, 1986).

Similar al proceso de extracción de cafeína, éste se encuentra en operación en Múnchamünster, Alemania en donde se procesan 2 ton de lúpulo/día. Parece ser que actualmente este proceso también se lleva a cabo en Australia.

### 3.2.3 Extracción de Aceites Naturales con CO<sub>2</sub> SC (McHugh, Krukonis, 1986).

La extracción de aceites naturales con FSC fue planteada por vez primera en E.E.U.U. y Japón quienes desarrollaron procesos tales como la extracción de aceites a partir de soya, germen de trigo, algodón, mostaza, frutas, especias, etc. Estos fueron resultado de las determinaciones de solubilidad de los triglicéridos en CO<sub>2</sub> a 70°C y 800 atm. Con el paso de los años, sin embargo, se ha diversificado el estudio de estos procesos debido a la creciente demanda por alimentos de bajo contenido calórico. Estos incluyen la extracción de aceites de papas fritas, de cacahustes, de pescado, etc., con la ventaja de que al término de la extracción, el producto mantiene el sabor y textura originales. Otro tipo de proceso relativamente reciente que utiliza FSC es la extracción de

agentes aromáticos del limón, principalmente del limoneno. En la mayoría de los casos, la tecnología con base en los FSC ha probado ser competitiva e incluso superior a la tradicional. Por último, cabe mencionar que la extracción SC de aceites indeseables en harinas de maíz (que afectan el sabor y la calidad nutricional de la misma) es otro proceso por medio del cual se garantiza un mayor periodo de almacenamiento sin deterioro.

### **3.3 Industria Farmacéutica (Larson, King, 1986).**

Debido a la preocupación creciente de la industria farmacéutica por la obtención de productos de alta calidad y de extrema pureza ( sin residuos de disolventes), se han buscado alternativas a los procesos de extracción y/o destilación tradicionales. Desde el punto de vista ambiental y considerando también el factor seguridad (así como sus características particulares), se ha llegado a la conclusión de que el CO<sub>2</sub> SC es el disolvente adecuado para la extracción de productos naturales y sintéticos de interés para la industria farmacéutica.

El CO<sub>2</sub> SC se utiliza, entonces, para extraer esteroides, alcaloides, agentes activos de plantas para tratamiento del cáncer, etc.

### **3.4 Mejoramiento del Ambiente**

(Brady et al., 1987; Dooley et al., 1987, Akgerman et al., 1992).

En 1986 se descubrió una nueva aplicación de los FSC: la remoción de contaminantes orgánicos provenientes de materiales sólidos con el fin de remediar los suelos. Desde entonces se emplea el metanol SC para extraer residuos de pesticidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos; el CO<sub>2</sub> SC para extraer bifenilos policlorinados; mezclas de metanol/N<sub>2</sub>O para remover también hidrocarburos policíclicos aromáticos de

sedimentos en ríos, etc. Estudios posteriores revelan que el uso de FSC es conveniente para la extracción de DDT (al 100% cuando se añade 5% de metanol como cosolvente), hexaclorobenceno, diesel, PCB's, etc.

El principio de estas extracciones se basa en separar componentes contaminantes sólidos a temperaturas intermedias entre los 25 y los 60 °C y presiones entre 1000 y 6000 psi. A diferencia de los procesos tradicionales (extracción con disolventes a T's > 600°C que ocasiona tierras candadas), la extracción con FSC garantiza una utilización posterior de los suelos inclusive para fines agrícolas.

**CAPITULO 4**

**BIOCATALISIS EN FSC**

## BIOCATALISIS EN FSC

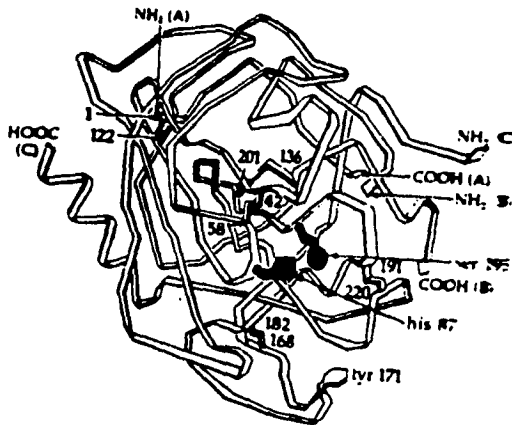
A mediados de los ochentas se descubrió una nueva línea de investigación en el campo biotecnológico: la utilización de las enzimas -o biocatalizadores- en medios casi anhidros con el fin de llevar a cabo reacciones enzimáticas en este tipo de ambiente. Los primeros experimentos relacionados con este aspecto, fueron realizados en disolventes orgánicos. Posteriormente, se integraron los FSC y las conversiones directas en fase gas, ampliando así el rango de aplicación de las bioconversiones en sistemas de baja humedad.

### **4.1 GENERALIDADES - LAS ENZIMAS**

Las enzimas, como cualquier catalizador, aumentan la velocidad de las reacciones (modificando solamente las reacciones espontáneas) y sin afectar el equilibrio de la reacción.

El total de conversiones biológicas que realizan los seres vivos se debe a la presencia de enzimas o biocatalizadores en sus células. Dichos catalizadores son proteínas globulares complejas (PM de 12,000 a 1'000,000 g/gmol) constituidas por una o más cadenas polipeptídicas unidas. Estas cadenas se repliegan sobre sí mismas de tal manera que conforman una estructura tridimensional al mismo tiempo que generan un surco o saco dentro del cual encaja(n) la(s) molécula(s) reaccionante(s) o sustratos. Dicha porción de la enzima recibe el nombre de sitio activo. Cada sitio activo tiene como función principal la de reconocer y confinar al sustrato así como la de orientarlo en una determinada dirección. De esto último deriva la extrema especificidad enzimática ya que la relación enzima-sustrato sugiere la analogía de una cerradura con su llave. En la Figura 4.1 se esquematiza la conformación de una enzima.



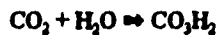


**Figura 4.1 Modelo de una Enzima**  
(Curtis, Helena)

La existencia de enzimas en las células de los seres vivos hace posible realizar el innumerable conjunto de reacciones químicas que la célula requiere para llevar a cabo todas las funciones asociadas a la vida. Como se sabe, para que se pueda llevar a cabo una reacción química, es necesario contar con un aporte inicial de energía que aumente la energía cinética de las moléculas promoviendo que éstas choquen con mayor fuerza. Esta energía inicial o energía de activación permite vencer la fuerza de repulsión entre las moléculas y ocasiona el rompimiento de enlaces entre las mismas. Como consecuencia, se facilita la formación de nuevas estructuras, dando lugar a la reacción. En la mayoría de los procesos químicos, la energía de activación se aporta como calor; sin embargo, en las células esto no sucede ya que la energía térmica las afectaría irremediamente debido al desacoplamiento de la(s) cadena(s) que conforman a la enzima.

Como alternativa, las células eluden este problema recurriendo a las enzimas que, como cualquier otro catalizador, se encargan de deprimir la energía de activación al establecer una asociación temporal con los reactivos. Esta asociación aproxima a las moléculas reaccionantes y también debilita los enlaces químicos iniciales. La energía de activación más baja en presencia del catalizador se encuentra ubicada dentro de la gama energética que posee la mayor proporción de las moléculas reaccionantes; en consecuencia, la reacción se desarrolla con mayor rapidez que si faltase el catalizador (Figura 4.2) ya que el  $\Delta G$  global es el mismo al que se llegaría si la reacción no fuese catalizada. Además, como el catalizador mismo no se altera de manera permanente en el proceso, se puede utilizar reiteradamente.

Por citar un ejemplo de la rapidez de las enzimas, la reacción:



se lleva a cabo de manera espontánea en los océanos. Sin embargo, en el cuerpo humano y otros seres vivos la misma reacción es catalizada por la enzima anhidrasa carbónica, factor por el cual la reacción es  $10^7$  veces más rápida que la no catalizada.

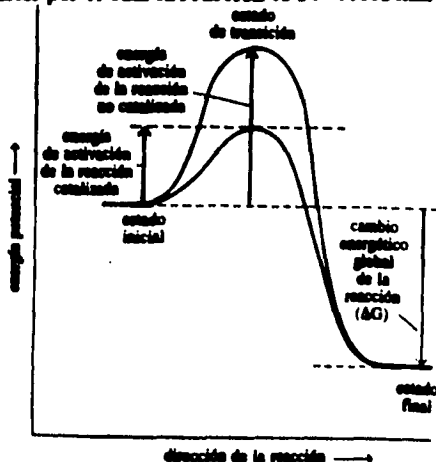
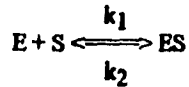


Figura 4.2

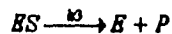
Energía de activación en reacciones catalizadas y no catalizadas (Curtis, 1990)

El número de interacciones enzima-sustrato en un segundo es muy alto (entre  $10^3$  y  $10^9$ ). De esto se infiere que las moléculas del sustrato no se encuentran estrechamente unidas a las de la enzima ya que, de ser así, las reacciones no serían tan rápidas pues las mismas moléculas del sustrato bloquearían el sitio activo.

La mayoría de los sistemas enzima-sustrato siguen el modelo cinético de Michaelis-Menten el cual propone la siguiente reacción reversible:



donde existe el equilibrio entre el sustrato (S) y la enzima (E). ES es el complejo enzima-sustrato que a su vez reacciona para dar un producto (P) y liberando el sitio activo, en forma esencialmente irreversible, de acuerdo a la siguiente reacción:



En este modelo se asume que el paso limitante es la reacción y no la difusión de las moléculas de sustrato y producto en el sitio activo. La velocidad de reacción se define como:

$$v = (ES)k_3$$

Conforme aumenta la concentración de sustrato, aumenta la de ES. Por lo tanto, la velocidad se incrementa y la reacción asume una cinética de primer orden. Sin embargo, si existe un exceso de S, los sitios activos se saturan y la velocidad de reacción ya no aumenta. En este caso, el modelo de Michaelis-Menten toma la siguiente forma:

$$v = \frac{k_3(ES)(S)}{k_1/k_2 + (S)} = \frac{V_{\max}(S)}{K_m + (S)}$$

En la actualidad se conocen más de 2,000 enzimas, cada una de las cuales es responsable de la catálisis de una reacción química determinada (Curtis, 1990).

Con el paso del tiempo, el interés por las enzimas ha crecido considerablemente sobre todo como consecuencia de la preocupación ecológica del hombre por buscar sustancias y materia prima natural para la elaboración de diversos productos. La utilización de las enzimas cobra hoy en día cada vez mayor importancia tanto en el sector alimentario como en el químico, farmacéutico y ambiental.

#### **4.2 Biotecnología en medios orgánicos**

En la naturaleza, las enzimas se encuentran en medios acuosos; es por ello que las primeras aplicaciones industriales y aún las actuales de las enzimas fueron realizadas con éxito en este tipo de ambiente. Sin embargo, a mediados de los ochentas, Zaks y Klivanov (1984) seguidos por otros investigadores (Luisi, 1985; Waks, 1986; Martinak, 1986, etc.) iniciaron estudios relativos a la factibilidad de realizar reacciones enzimáticas en medios orgánicos. Para lograrlo, emprendieron sus estudios midiendo la actividad enzimática de diversas enzimas en diferentes disolventes orgánicos.

De los resultados obtenidos de los primeros experimentos, Zaks y Klivanov concluyeron que las enzimas pueden actuar en medios orgánicos con la condición de que exista en el medio cuando menos un pequeño porcentaje de agua. Esta última no debe eliminarse en su totalidad ya que tiene una doble función:

- a) es esencial para mantener activa la configuración proteica de la enzima que le permite servir como catalizador, manteniendo las interacciones no covalentes en la superficie de la enzima.

b) es necesaria para la mayoría de los procesos de inactivación enzimática; sobre todo para la inactivación térmica.

Kazandjian et al. (1986) añadieron el hecho de que un medio enzimático acuoso puede ser sustituido por uno casi anhidro ya que el agua requerida para la actividad enzimática se encuentra fuertemente unida a la enzima y permanece unida aún cuando el agua del disolvente sea sustituida por un disolvente orgánico.

Vislumbrando la posibilidad de efectuar reacciones enzimáticas en disolventes orgánicos, muchos científicos (dentro de los cuales se incluyen : los mismos Zaks y Klivanov; Wheeler y Croteau; Ayala et al,etc.) se han dado a la tarea de buscar generalizaciones de múltiples experimentos utilizando enzimas con diferentes propiedades. Las enzimas han sido empleadas bajo dos esquemas:

- a) Se disuelven en pequeñas cantidades de agua que son emulsificadas en disolventes no acuosos; la microemulsión se estabiliza por surfactantes que forman "micelas invertidas" (Luisi,1985; Martinek et al,1986) ó
- b) La proteína en forma sólida se suspende directamente en el disolvente orgánico (Klivanov,1986)

En el primer caso, la enzima se confina dentro de la microcápsula que a su vez está aislada del disolvente orgánico por una monocapa de surfactante. Por lo tanto, las propiedades catalíticas de las enzimas en las micelas invertidas se aproximan a las que ofrecen los medios acuosos. Por el otro lado, la enzima pulverizada, al ser directamente expuesta al disolvente orgánico, exhibe características diferentes a las expresadas en presencia de agua e inclusive puede llegar a aumentar su termoestabilidad (Zaks y Klivanov,1986; Wheeler y Croteau,1986; Ayala et al,1986) así como también puede variar la especificidad de la enzima por el sustrato (Zaks y Klivanov,1984,1986). A partir de entonces, se empezaron a efectuar reacciones enzimáticas en medios orgánicos concluyendo, además, que muchas transformaciones hasta entonces imposibles en medios

acuosos son realizables en medios casi anhidros. Tal es el caso de la acilación regioselectiva de glicoles (Cesti et al,1985) y azúcares (Therisod y Klibanov,1986,1987) en presencia de la enzima lipasa; interesterificación de grasas (Yokozeki et al,1982); transesterificaciones y esterificaciones (Kirchner et al,1985),etc.

En los últimos años se ha seguido estudiando este fenómeno comprobando que la presión afecta la actividad enzimática en medios orgánicos y que también facilita el despojo del agua de la enzima ocasionando un decremento en su actividad (Kim et al,1993; Gorman, Dordick, 1992). Para resolver este problema hace falta controlar, de manera conjunta, la P y la hidratación de la enzima. Por otro lado, a diferencia de lo que se pensaba anteriormente (pues se había observado menor actividad en medios orgánicos, comparada con la exhibida en disolventes acuosos), se ha descubierto que la actividad enzimática en disolventes orgánicos puede aumentar considerablemente con la adición de lioprotectores como sorbitol, sucrosa, manitol,etc. (Dabulis et al.,1993). La actividad enzimática está en función del contenido de agua en la enzima, de la morfología superficial de la enzima y de las propiedades del disolvente, sustrato y producto (Russell, et al.,1994). El agua que forma parte del microambiente de la enzima es la responsable de mantener las interacciones superficiales no covalentes de la enzima que le permiten actuar como catalizador. La dependencia de la actividad enzimática con el contenido de agua presente en el sistema pasa por un punto óptimo. A niveles bajos de agua (enzima casi seca), la enzima se deshidrata ocasionando una variación en la estructura de la proteína. Al incrementar la cantidad de agua, aumenta con ella la actividad; sin embargo, a contenidos altos de agua, las partículas forman agregados o se inactivan con facilidad. Esto resulta en una reducción del área superficial disponible para el sustrato hidrofóbico.

Los disolventes afectan tanto directa (actuando como competidores inhibidores o modificando la estructura proteica) como indirectamente a las enzimas, según las propiedades físicas que presenta dicho disolvente (constante dieléctrica, solubilidad, coeficiente de partición, etc.). Sin embargo, la correlación de las distintas propiedades de

un disolvente convencional con la actividad enzimática es difícil ya que existen cambios inevitables en las propiedades de un disolvente a otro (Russell et al.,1994 y Karnat et al.,1992). Por ello fue que se vislumbró la posibilidad de realizar reacciones enzimáticas en FSC donde es posible variar, de manera predictiva y controlada, las propiedades del disolvente al modificar la temperatura y la presión del sistema.

#### *4.3 Biotecnología en Medios Supercríticos*

Debido al descubrimiento de los FSC como alternativa al uso de disolventes orgánicos (sobre todo por consideraciones ecológicas, además de sus atractivas propiedades como disolvente), Randolph et al. (1985), Hammond et al. (1985) y Nakamura (1986) fueron los primeros en publicar estudios que indicaban la factibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticas en este tipo de fluidos. Aunque cada FSC posee una polaridad distinta y por lo tanto se pensaría que los fluidos tendrían que ser seleccionados según la reacción de que se trate, después de realizar varios experimentos con enzimas en diferentes FSC se llegó a la conclusión de que el  $\text{CO}_2\text{SC}$  es uno de los más apropiados gracias a sus propiedades ( $T_c=32^\circ\text{C}$ ;  $P_c=72\text{ atm}$ ) adecuadas para tratar material biológico termolábil además de solubilizar algunas sustancias polares. Cabe mencionar que aunque la mayoría de los experimentos se han llevado a cabo en este fluido, se han hecho estudios en fluoroforno (Russell et al.,1994), etanoSC, hexafluoruro de sulfuro SC, propanoSC, etilenoSC, etc., pues existen evidencias de que el  $\text{CO}_2$  interactúa químicamente con las proteínas, formando carbonatos con radicales amino libres en la superficie de la proteína (Karnat et al.,1992). Sin embargo, como el  $\text{CO}_2\text{SC}$  es el que mas se ha empleado, a continuación se presenta una lista de los beneficios potenciales de éste como disolvente en reacciones catalizadas enzimáticamente.

**A) Comparado con medios acuosos, en CO<sub>2</sub>SC:**

- Los compuestos insolubles en agua pueden procesarse en una sola fase.
- La actividad acuosa y el equilibrio termodinámico de algunas reacciones puede ajustarse al variar el % de agua en CO<sub>2</sub>. Sin embargo, el calcular el % óptimo de agua en el sistema es quizás el problema más importante al que se han enfrentado los científicos al realizar reacciones enzimáticas en FSC.
- Las enzimas no se disuelven en CO<sub>2</sub>SC por lo que no existen pérdidas de enzima y la inmovilización de éstas no es necesaria. Tal es el caso de utilizar lechos fijos (Aaltonen et al,1991).

**B)Comparado con disolventes orgánicos:**

- El CO<sub>2</sub>SC no es tóxico, no es inflamable y no es caro.
- No deja residuos tóxicos en el producto.

**C)Comparado con cualquier medio:**

- La alta difusividad, baja viscosidad y baja tensión superficial del CO<sub>2</sub>SC permite que se aceleren las reacciones limitadas por la transferencia de masa.
- La miscibilidad eficiente de los gases debe ocasionar, por ejemplo, mayor rapidez y selectividad en hidrogenaciones y oxidaciones.
- Debido a que el poder solvatante del CO<sub>2</sub>SC depende de la presión y de la temperatura, la mezcla de reacción puede precipitar simplemente al despresurizar el sistema. Esta separación puede ser gas-líquida o gas-sólida y tiene la ventaja de evitar la separación posterior en soluciones líquidas diluidas.
- Si durante el proceso de separación CO<sub>2</sub>-mezcla reaccionante llegara a condensar el CO<sub>2</sub> (debido a la disminución de P y T), sería necesario evaporar dicho compuesto.



Sin embargo, el valor del calor de vaporización del CO<sub>2</sub> es mucho más pequeño que el comparado con el requerido para evaporar agua o disolventes orgánicos.

- El fraccionamiento y la purificación de productos puede hacerse en el mismo disolvente, utilizando un tren de separadores arreglados de tal manera que se vayan reduciendo la P y T sucesivamente o que, en su defecto, se empleen contactores a contracorriente.
- Los productos purificados pueden cristalizarse directamente a partir del CO<sub>2</sub> al dejar que el fluido se descomprima después de pasar por una válvula de expansión. Las partículas obtenidas de esta manera pueden ser pequetísimas o incluso a veces se puede ajustar su tamaño al manipular la presión. Todo el proceso se opera a temperaturas relativamente bajas (35-60°C) protegiendo a los compuestos termoinestables.

Por todo lo anterior, puede inferirse que un proceso que involucre la acción de biocatalizadores en CO<sub>2</sub>SC combina la especificidad de la catálisis enzimática con las propiedades del disolvente.

Los trabajos mas recientes elaborados por Russell y colaboradores (Russell et al., 1994) indican que la sola dependencia de las propiedades físicas del fluido supercrítico en la presión, presenta varias oportunidades para el control de la actividad enzimática, especificidad y estabilidad en reactores biocatalíticos. Una aplicación de lo anterior es la síntesis de polimeros de dispersión y peso molecular controlados, los cuales son elementos esenciales para la construcción de biosensores.

Debido a que es difícil correlacionar las propiedades físicas del disolvente con el comportamiento de la enzima en disolventes convencionales (por las diferencias inevitables en la estructura química de un disolvente a otro ya que la enzima puede ser

inhibida por un disolvente determinado mientras que por otro no), se ha estudiado a los FSC llegando a la conclusión de que éstos ofrecen la posibilidad de cambiar las propiedades físicas del sistema sin ocasionar cambios drásticos en varias de sus propiedades, inclusive en su estructura. Así, es factible variar dichas propiedades de manera predictiva, continua y controlable, al manipular la presión ( o la temperatura ) del sistema.

El primer paso para la generación de correlaciones predictivas es el identificar aquellas propiedades físicas del disolvente que afectan de manera importante a la actividad enzimática, de esta forma, se puede utilizar un fluido supercrítico que exhiba grandes variaciones en esta propiedad en un rango razonable de presión. Clark y sus colaboradores, por ejemplo, reportaron que cuando la constante dieléctrica del disolvente aumenta de 1 a 10, ocurre un cambio en la flexibilidad protéica. La constante dieléctrica del fluoroforno puede manipularse entre 1 y 8 en un rango de presiones de 500 a 5000 psi. Russell ha llegado también a la conclusión de que la actividad de una lipasa en una reacción de transesterificación entre metil metacrilato y 2-metil hexanol en fluoroforno puede ser controlada por la presión.

También se ha sugerido que la constante dieléctrica puede ser utilizada para predecir la especificidad de una reacción biocatalítica pues se ha demostrado que en algunas reacciones ( Transesterificación entre el n-acetil fenilalanin éster y metanol con *Subtilisina carlsberg* o proteasa de *Aspergillus* ) los cambios en esta constante inducidos por la presión conducen a predecir las alteraciones en la enantioselectividad de ambas enzimas. De aquí se desprende que es posible utilizar la presión no solo para regular la estabilidad y la actividad enzimática, sino también para controlar su especificidad.

#### **4.3.1 ESTABILIDAD ENZIMÁTICA EN FSC**

Después de realizar numerosas investigaciones encabezadas por instituciones de varias partes del mundo (Tabla 4a), se ha reportado una serie de enzimas que muestran ser estables en CO<sub>2</sub>SC (ver Tabla 4b). Los casos reportados incluyen pruebas de estabilidad en CO<sub>2</sub> húmedo o seco al mismo tiempo que casos en los que se añadieron cosolventes (generalmente alcoholes) o varios sustratos. Los datos de estabilidad presentados son aún limitados en el sentido de que no han sido evaluados en función de la presión a la cual se encuentra el CO<sub>2</sub>SC.

Se ha visto que a altas presiones, la estabilidad de algunas enzimas disminuye debido a que la molécula sufre una desnaturalización. Sin embargo, la presión de FSC no es tan alta como para inactivar la enzima. De hecho, es menor a la que puede causar desnaturalización enzimática en agua (Nakamura, 1990). Un efecto indirecto causado por la presión podría ser la absorción de CO<sub>2</sub> a los complejos de enzima hidratados; esto ocasiona una variación en el pH o el incremento repentino en el volumen de gas después de una expansión (lo que se puede traducir en una distancia mecánica de la frágil estructura tridimensional). En este sentido, Kasche et al., 1988 señalan que la desactivación enzimática es debida a cambios estructurales en la molécula proteica ocasionados por un decremento en la presión o el desprendimiento rápido del CO<sub>2</sub> disuelto en el agua de la enzima.

Los resultados reportados a la fecha indican que la estabilidad enzimática en CO<sub>2</sub> está relacionada estrechamente con la cantidad de agua presente en el medio.

<b>INSTITUCION</b>	<b>AÑOS DE INVESTIGACION</b>
Massachusetts Institute of Technology	1985 a la fecha
Universidad de California, Berkeley	1985-1989
TNO-CIVO Food Technology Institute, Holanda	1985-1989
Universidad de Tokio, Japón	1986-1988
Universidad de Nagoya, Japón	1987
Technische Universität Hamburg-Harburg	1988
Istituto di Chimica degli Ormoni, C.N.R., Milán, Italia	1989
Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA), Francia	1990-1992
Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy (ENSIC), Francia	1990-1992
Universidad de Pittsburgh	1991 a la fecha
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)	1992 a la fecha

**Tabla 4a.**

(tomada de Aaltonen et al, 1991, actualizada a 1992)

Enzima	Organismo que la produce	Temperatura (°C)	Presión (bar)
Termolisina	Bacteria	35-40	300
Colesterol oxidasa	<i>Gloeocysticum chrysocreas</i>	35	100
Lipasa	<i>Rhizopus arrhizius</i>	40	150
Lipasa	<i>Mucor miehei</i>	35-60	130-150
Lipasa	<i>Rhizopus delemar</i>	35	137
	<i>Rhizopus japonicus</i>	35-50	150-290
	<i>Alcaligenes sp.</i>		
	<i>Mucor miehei</i>		
Amilasa	<i>Bacillus</i>	35	200
Glucoamilasa	Hongo		
Alcohol oxidasa	<i>Pichia pastoris</i>	40	100
Glucosa oxidasa	Hongo		
Glucosa isomerasa	Bacteria		
Fosfatasa alcalina	Bacteria	35	100
Polifenol oxidasa	Hongo	36	360
Tripsinas	Pancreas bovino	37	100
Subtilopeptidasa A	<i>Bacillus subtilis</i>	45	150
Catalasa	Hongo		
Mirosinasa	Semilla de mostaza	40	100-350
Alcohol deshidrogenasa	Bacteria		

Tabla 4b. Enzimas estables en CO<sub>2</sub>SC

(tomada de Aaltonen et al, 1991)

Las reacciones enzimáticas llevadas a cabo hasta la fecha han sido operadas en reactores tipo batch, semibatch y continuo que se presentan en la Figura 4.3.

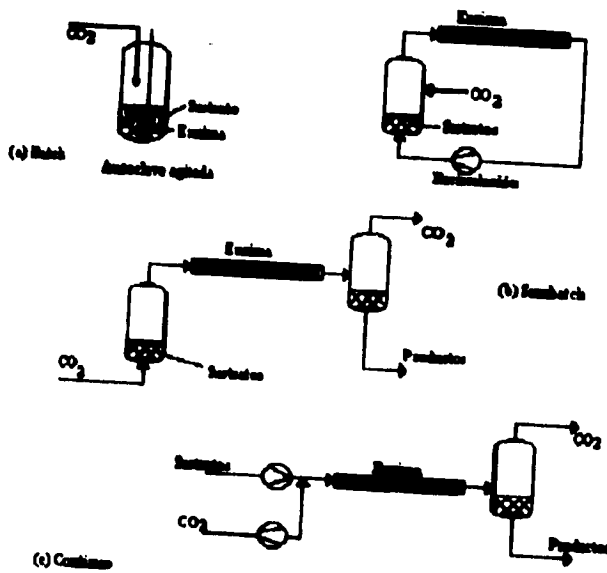


Figura 4.3.

A continuación se muestran las diferentes reacciones enzimáticas realizadas hasta 1992 (Tabla 4c).

Reacción	Enzimas	Sustrato	Reactor	Condiciones de reacción	[Sustrato]	[Agrego]
Hidratación de p-nitro-fenil fosfato	Fosfatasa alcalina	---	Batch	CO <sub>2</sub> 35°C 100 atm	7.6mM	56mM
Oxidación de p-cresol y p-clorofenol	Poli-fenol oxidasa	Perlas de vidrio (62-140µm)	Batch y continuo	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> 30°C, 340 bar CHF <sub>3</sub> /CO <sub>2</sub> 34°C, 340 bar	<7.8 mM	<43mM
Transesterificación de nicotina (a) con ácido esteárico (b)	Lipasa	Celosa y resina de intercambio iónico (600µm)	Batch	CO <sub>2</sub> 30°C 300 atm	(a) 5.6mM (b) 17.6 mM	0.57 mM
Alcoholisis de acetato de etilo con alcohol isopropílico	Lipasa	Resina de intercambio iónico (400µm)	Continuo	CO <sub>2</sub> 60°C 100 bar	320mM	0.43 mM
Hidratación de glucosaminas-6-epi-oxi-oximas	Mirrocinasa	Perlas de vidrio	Batch	CO <sub>2</sub> 20/40°C 200 bar	3.2mM	11x10 <sup>-3</sup> mM
Oxidación de colesterol a 3-cholestanona	Coolesterol oxidasa	Perlas de vidrio (20µm)	Batch y continuo	CO <sub>2</sub> 35°C 180 atm	1mM (batch) 1mM (cont)	570mM (b) 30mM (a)
Transesterificación de N-acetilglucosamina (a) con etanol (b)	Subtilisina de Calberg	---	Batch	CO <sub>2</sub> 45°C 150 bar	(a) 56 µM (b) 0.5-5% en CO <sub>2</sub>	---
Azidación de triacetilglicerol con ácido esteárico	Lipasa	Perlas de vidrio (20µm)	Batch	CO <sub>2</sub> 60°C 180 atm	---	---
Oxidación de etanol	Alcohol oxidasa	DEAE celulosa vidrio de porosidad controlada	Batch y continuo	CO <sub>2</sub> 40°C 100 atm	80mM	
Esterificación de ácido esteárico (a) con etanol (b)	Lipasa	Resina de intercambio iónico	Continuo	CO <sub>2</sub> 40°C 13-18 MPa	(a) 0.50mM (b) 150mM	109µg
Transesterificación de derivado de ácido aspártico con L-Asparaginasa metil ester	Yema de huevo	---	---	CO <sub>2</sub> 35°C 200 atm	---	5.7% p

Tabla 4c

Reacciones enzimáticas llevadas a cabo hasta 1992.

(Anttonen et al., 1991, actualizada)

### **4.3.2 Conclusiones a las que se ha llegado**

#### **a) Generales:**

- El CO<sub>2</sub>SC ha sido el FSC más utilizado por sus características aunque se cree que por las diferencias en polaridad debería existir un disolvente supercrítico ideal para cada reacción enzimática (Nakamura, 1990).
- La concentración relativa de reactivos, agua y sustrato puede tener efectos significativos en la velocidad de reacción. Esto se debe a que, por ejemplo, el contenido de agua influye en la flexibilidad de la enzima y la solubilidad del sustrato y del producto. Asimismo, puede afectar la transferencia de masa y la velocidad de difusión (Nakamura, 1990).
- Uno de los factores que puede ocasionar la pérdida de actividad enzimática es la despresurización del sistema (p.ej. tripsina,  $\alpha$ -quimotripsinas y penicilino amidasa; Kasche et al., 1988). Esto se deriva del posible desdoblamiento parcial de la molécula conforme se realizan expansiones sucesivas. Las propiedades del disolvente (constante dieléctrica, solubilidad, etc.) también afectan la actividad enzimática (Russell et al., 1994 y Kamat et al., 1992).
- El incremento en la presión o en el tiempo de contacto con el CO<sub>2</sub> puede ocasionar un decremento en la actividad enzimática debido al desprendimiento de CO<sub>2</sub> del agua de la propia enzima (Nakamura, 1990). Sin embargo, se ha visto que la mayoría de las enzimas retienen su actividad al someterse a presiones de hasta 35 MPa.
- El cambio en el pH también es un factor que altera la actividad enzimática y puede ocurrir a través de las reacciones de hidratación del CO<sub>2</sub>.
- En algunos casos la actividad enzimática puede mejorarse después de someter a la proteína a condiciones supercríticas ya que al suspender la enzima en medios acuosos (después del tratamiento con CO<sub>2</sub>SC), se aprecia un incremento de hasta 2.5 veces la actividad original para 24 horas de exposición (Valentinotti, 1992).



- La denaturalización térmica de las enzimas en CO<sub>2</sub>SC es similar a la denaturalización que presentan en disolventes orgánicos (hexano) (Marty et al.,1990).
- La utilización de cosolventes puede afectar la velocidad de reacción debido a que éstos interactúan con moléculas de sustrato, formando diferentes agregados (Randolph et al.,1988).
- El uso de la enzima lipasa promete mayores aplicaciones a nivel comercial ya que es de utilidad en muchas biosíntesis y modificaciones (Nakamura,1990).
- Todos los datos reportados a la fecha indican un incremento (del orden de 2 a 4 veces) en la velocidad de reacción cuando se sustituye un medio orgánico u acuoso por CO<sub>2</sub>SC (Pasta et al., Chi et al., van Eijs et al., citados por Aaltonen et al.,1991).
- Aunque se ha observado una tendencia hacia la mayor rapidez de reacción en CO<sub>2</sub>SC que en otro tipo de disolventes, las comparaciones realizadas no han permitido evaluar el efecto que tiene el disolvente en la rapidez global de la reacción. Para encontrarlo, sería necesario utilizar un mismo reactor sometido a los mismos efectos de mezclado y condiciones de flujo para cada disolvente.

**b) Efecto de la Humedad:**

- La presencia de agua en las enzimas es indispensable para que la proteína pueda funcionar como catalizador. La cantidad requerida, sin embargo, es mínima pues basta con una monocapa de agua que recubre a la molécula para que esta se active sin sufrir una denaturalización (Klibanov,1986). Además, se necesita añadir agua al fluido en contacto con la enzima para evitar la deshidratación de ésta.
- Cada sistema CO<sub>2</sub>SC-enzima-sustrato requiere de un distinto contenido de agua. Sin embargo, no existe una regla para calcular la cantidad de agua óptima en cada caso.

Es necesario estudiar a fondo el comportamiento termodinámico de sistemas tales como el  $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$  para poder predecir, con poco margen de error, el contenido de agua a ciertas condiciones. En el siguiente capítulo este factor se tratará con mayor detalle.

- El  $\text{CO}_2\text{SC}$  puede disolver poco más del 0.3% de agua mientras que hidrocarburos hidrofóbicos (hexano) solamente disuelven un 0.01% de agua (Aaltonen et al., 1991).
- Mientras más hidrofílico sea un disolvente, mayores posibilidades tendrá de deshidratar a la enzima resultando en una actividad catalítica disminuida.
- El contenido óptimo de agua requerido, por ejemplo, en las lipasas, parece depender del tipo de sustrato y soporte que se maneje. La cantidad ideal de agua para los diferentes sistemas de reacción varía en un rango del 4 al 110% (Marty et al., 1990; Chi et al., 1988). Las diferencias pueden deberse en cierto grado a las diferentes isothermas de absorción de agua de los soportes enzimáticos.
- Parece ser que el  $\text{CO}_2\text{SC}$  debe contener entre 0.1% peso y 0.3% peso ( % de saturación del agua en  $\text{CO}_2$ ) para que la actividad enzimática sea la ideal. El exceso de agua en la enzima probablemente impide el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima y por ende, no favorece el equilibrio termodinámico (Aaltonen et al., 1991). En el caso de que se produzca agua en la reacción ésta debe ser eliminada de la mezcla reaccionante (p.ej. esterificaciones, amidaciones, etc.).
- Si las solubilidades de sustratos y productos de reacción en  $\text{CO}_2\text{SC}$  son bajas (<1%) y el  $\text{CO}_2$  está saturado con agua, existirá demasiada agua en la mezcla de reacción después de la separación del  $\text{CO}_2$ . Esta debe eliminarse (Aaltonen et al., 1991).
- Si algunas sustancias de la mezcla reaccionante son solubles en agua, éstas tendrán que ser separadas de la solución acuosa por métodos tradicionales. Esto resultaría en un mal aprovechamiento de las propiedades de los FSC (Aaltonen et al., 1991).

**c) *Transferencia de masa:***

- La mayor difusividad en FSC frente a la de los líquidos no siempre se traduce en un beneficio; solamente es ventajosa cuando la rapidez de la reacción está limitada por la transferencia de masa en los líquidos.
- Existen dos tipos de transferencia de masa:

**a) *Difusión externa:***

Existe una transferencia de masa externa entre el seno de la mezcla de reacción y la superficie de la unión enzima/suporte. La resistencia a la transferencia de masa a lo largo de esta película externa depende de las condiciones de flujo. La difusión externa se ha estudiado al realizar mediciones de la velocidad de reacción como función de la velocidad del fluido al pasar por columnas enzimáticas empacadas. Randolph y colaboradores (Randolph et al., 1988) concluyeron, por ejemplo, que en la producción de colesteno a partir de colesterol la difusión del colesterol a la enzima no podía ser el factor limitante de la velocidad de reacción (al variar el flujo de 0.5 a 3 cm/s) aunque la producción de colesteno aumentaba linealmente al incrementar la velocidad de flujo. Por otro lado, Eijs y colaboradores (citado por Aaltonen et al., 1991) en experimentos de alcoholólisis por lipasas, concluyeron que la velocidad de reacción en la obtención de acetato isoamílico está limitada por la transferencia de masa externa. En este trabajo se variaron las velocidades de flujo de 0.3 a 1.3 cm/s y también se obtuvo una mayor velocidad de reacción al incrementar la velocidad del fluido.

Aunque se ha visto que la difusión externa influye en la velocidad de reacción, no se han encontrado velocidades de flujo ideales.

**b) Difusión interna:**

La difusión interna ocurre dentro de los poros del soporte enzimático y es independiente de las condiciones de flujo. Este factor es limitante cuando la actividad enzimática es muy alta, la concentración del sustrato es baja y las partículas del soporte son grandes. La transferencia de masa interna es generalmente la que controla la velocidad de reacción. En estos casos la mayor difusividad en  $\text{CO}_2\text{SC}$  debe resultar ventajosa. Sin embargo, este fenómeno no ha sido estudiado a fondo.

**CAPITULO 5**

**COMPORTAMIENTO TERMODINAMICO  
DEL SISTEMA CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O**

## COMPORTAMIENTO TERMODINAMICO DEL SISTEMA CO<sub>2</sub>SC-H<sub>2</sub>O

### 5.1 Importancia del Agua en la Enzima

Como se mencionó en el capítulo anterior, el H<sub>2</sub>O es imprescindible para que se puedan llevar a cabo reacciones enzimáticas en disolventes orgánicos (y por lo tanto en FSC). No solo es importante para que la enzima cumpla con su función catalítica, sino que es un factor cuyo contenido en la mezcla de reacción afecta directamente tanto a la velocidad de reacción como al equilibrio (Svensson et al., 1994).

El agua parece jugar un papel dual en la catálisis enzimática. Por un lado es importante para mantener la estabilidad de la enzima (configuración catalíticamente activa) y por el otro, facilita su inactivación. Es indudable que el agua debe estar presente; sin embargo, la cantidad de agua necesaria para cada sistema enzimático no ha sido fácil de determinar. Los últimos estudios relativos a este problema sugieren que estas proteínas se hidratan por completo en soluciones acuosas de las capas de agua más cercanas; sin embargo, generalmente se cree que se trata de una sola capa que recubre a la enzima y que funciona como eslabón entre la superficie enzimática y el medio de reacción. Se ha intentado medir el espesor de esta monocapa, pero aún existe incertidumbre al respecto. Empero, lo que sí se puede aseverar es que las enzimas requieren de pequeñísimas cantidades de agua para lograr una conformación adecuada. Suponiendo que se tratara de una sola capa, sería improbable que las moléculas proteicas fueran afectadas por la fase acuosa por encima de la capa de hidratación de no ser que se suponga una alteración considerable al microambiente enzimático por el medio de reacción. Es por esto último que la catálisis en medios casi anhidros, dentro de los que destacan los disolventes orgánicos, los fluidos supercríticos y las reacciones en fase gaseosa es cada vez más aceptada como alternativa a los disolventes acuosos en el campo de la biocatálisis (Dordick et al., 1989).

### **5.2 Contenido de agua en la Enzima**

Se ha visto que en medios orgánicos la actividad de la mayoría de las enzimas aumenta con el incremento en la cantidad de agua pues a concentraciones pequeñas de agua (enzima casi seca), la enzima mantiene una rigidez estructural no activa. Sin embargo, después de pasar el punto de actividad óptima (12 gH<sub>2</sub>O/g enzima), la actividad enzimática vuelve a disminuir notablemente debido a la pérdida de la estructura nativa por movimientos moleculares promovidos por el agua. Por consiguiente, el área superficial de la enzima a la cual tiene acceso el sustrato, se ve reducida (Russell et al., 1994).

Por otro lado, en el caso de los FSC, se ha observado que la actividad enzimática es óptima cuando la proteína contiene agua en un rango intermedio entre 40 y 110 gH<sub>2</sub>O/g enzima (Marty et al., 1990).

Lo anterior puede observarse en la Figura 5.1 en donde se compara la velocidad inicial relativa de un disolvente orgánico (hexano) con CO<sub>2</sub>SC a diferentes concentraciones de agua en la reacción de esterificación con lipasas. El diferente comportamiento de los dos disolventes con respecto a la cantidad de agua puede deberse a diferencias significativas en la solubilidad del H<sub>2</sub>O en ambos medios. En el caso del hexano, el coeficiente de partición de H<sub>2</sub>O entre el disolvente y el soporte hidrofílico sólido tiende hacia una mayor acumulación de moléculas de agua en la superficie de la proteína. Es decir, la enzima se encuentra en contacto con más moléculas de agua en el hexano y, por lo tanto, el valor óptimo relativo a la cantidad de agua en el medio aparece antes que el del CO<sub>2</sub>SC.

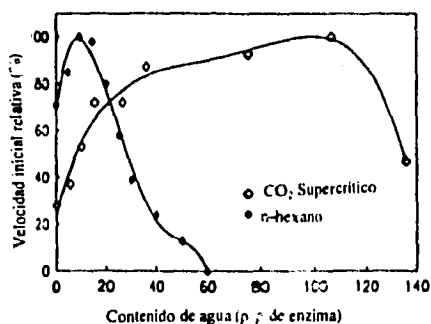


Figura 5.1. Efecto del contenido de agua en la velocidad relativa en CO<sub>2</sub>SC y en etano a 40°C y 13MPa (Marty et al., 1990)

### 5.3 Contenido de agua en el CO<sub>2</sub>SC

Aunque no ha sido posible controlar con precisión la cantidad ideal de agua en el FSC, parece ser que el CO<sub>2</sub>SC debiera contener entre el 0.1 y el 0.3%(saturación) en peso para obtener actividades enzimáticas óptimas (Aaltonen et al.,1991). Originalmente se pensó en realizar diagramas P-x o T-x con los cuales se pudiera controlar el nivel de humedad en el CO<sub>2</sub>SC. Sin embargo, esto no ha sido nada fácil ya que la mayoría de los modelos termodinámicos (generalmente basados en ecuaciones de estado) del sistema CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O propuestos a la fecha no contemplan el empleo de presiones altas (del orden de 100 atm y más) a temperaturas bajas (30-50°C). Esto se debe principalmente a que dicho rango es muy cercano al punto crítico del CO<sub>2</sub>, punto en el cual las ecuaciones casi nunca convergen (Crovetto et al.,1991).

La aplicación de FSC en bioprocesos o en procesos extractivos requiere de mucha información sobre el comportamiento de fases de las sustancias involucradas. El conocer la solubilidad de las sustancias en FSC, por ejemplo, es muy útil para obtener nociones sobre la extractabilidad de éstas (si se trata de un proceso de extracción) a diferentes condiciones de P y T al igual que para obtener mayores rendimientos y puntos de máxima actividad enzimática (en biocatálisis) también en función de la P y la T.



Debido al creciente interés por la tecnología supercrítica se han desarrollado varios experimentos enfocados a evaluar la solubilidad de diversas sustancias en FSC, especialmente en CO<sub>2</sub>SC, el disolvente más empleado hasta la fecha.

La solubilidad en un FSC se define como la concentración o fracción mol de una sustancia sometida a condiciones SC (a presiones y temperaturas determinadas) cuando ésta se encuentra en equilibrio con la sustancia pura (Bartle et al.,1991). Sin embargo, como la mayoría de los procesos reales involucran mezclas y el carácter del soluto difiere por completo al de una sustancia pura, la solubilidad nos da indicios sobre la extractabilidad de dicha sustancia, además de proveer información sobre el diseño de las condiciones de operación para obtener un extracto de una composición determinada. En el caso de la biocatálisis, al conocer la solubilidad del agua en el CO<sub>2</sub>SC, por ejemplo, podría indicarnos el % de saturación de agua de la enzima a diferentes condiciones de P y T para predecir la cantidad requerida de agua en el disolvente. Todo esto con el fin de obtener una actividad enzimática óptima y una buena estabilidad (*t<sub>1/2</sub>*>).

Chrastil, en 1982, (Chrastil,J.,1982) evaluó la solubilidad de diferentes sólidos y líquidos en FSC basándose en la densidad (*d*) del FSC con la ecuación:

$$C = d^b \exp\left(\frac{a}{T} + b\right)$$

que se obtiene al asumir que las moléculas del soluto se asocian con las moléculas del FSC para formar un complejo que se encuentra en equilibrio con el fluido. De aquí, se puede calcular la concentración al equilibrio por medio de la ley de acción de masas.

En un caso ideal en donde una molécula de soluto A se asocia con *k* moléculas de un FSC B para formar una molécula de complejo AB<sub>*k*</sub> en equilibrio con el sistema, tenemos que:



$$K = \frac{[AB_k]}{([A][B]^k)} \quad (2)$$

$$\ln K + \ln[A] + k \ln[B] = \ln[AB_k] \quad (3)$$

donde [A] es la concentración molar del soluto en fase vapor, [B] es la concentración molar del FSC y [AB<sub>k</sub>] es la concentración molar del soluto en el FSC. K es la constante de equilibrio que puede expresarse como:

$$K = \Delta H_{\text{solv}}/RT + q_s$$

donde ΔH<sub>solv</sub> es el calor de mezclado y q<sub>s</sub> es una constante. La [A] puede obtenerse por la ecuación de Clausius-Clapeyron en donde:

$$\ln[A] = \Delta H_{\text{vap}}/RT + q_v$$

donde ΔH<sub>vap</sub> es el calor de vaporización del soluto y q<sub>v</sub> una constante. Generalmente,

$$[A] \ll [AB_k]$$

Introduciendo estas expresiones a la ecuación (3), se tiene:

$$\Delta H/RT + q + k \ln[B] = \ln[AB_k] \quad (4)$$

donde ΔH es el calor total de reacción (ΔH = ΔH<sub>solv</sub> + ΔH<sub>vap</sub>) y q = q<sub>v</sub> + q<sub>s</sub>.

Es conveniente expresar las concentraciones y la densidad del FSC en g/l y, por lo tanto:

$$[ABk] = C / (M_A + kM_B); [B] = d/M_B$$

donde C es la concentración del soluto en un FSC (g/l); d es la densidad del FSC (g/l) y  $M_A$  y  $M_B$  son los pesos moleculares de A y B, respectivamente.

De lo anterior se desprende que:

$$\Delta H/RT + q + k \ln d - k \ln M_B = \ln C - \ln(M_A + kM_B) \quad (5)$$

Finalmente se llega a la expresión original:

$$C = d^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right)$$

donde  $a = \Delta H/R$ , R = constante universal de los gases,  $b = \ln(M_A + kM_B)$  y  $k =$  número de solvatación (# de moléculas de disolvente asociadas con una molécula de soluto para formar un complejo).

Los datos obtenidos por la ecuación de Chrastil para el sistema  $CO_2-H_2O$  fueron graficados por Bartle et al. (1991) después de ser ajustados con una ecuación que se obtiene de la siguiente manera:

$$E = x p / p_v \quad (a)$$

donde E se define como la relación de la presión parcial de vapor del soluto puro a la misma temperatura,  $p_v$ , x es la fracción mol del soluto a condiciones de saturación y p es la presión.

La correlación original consistía en la relación del ln de la concentración con la densidad,  $\rho$ :

$$\ln(xp) = a^1 + b^1\rho \quad (b)$$

donde  $a^1$  y  $b^1$  son constantes a temperatura constante. Sin embargo, se encontró que esta ecuación, propuesta por Tsikhanskaya (citado por Bartle et al.) no lograba obtener buenos resultados en algunos casos. Por ello, posteriormente se desarrolló una ecuación similar:

$$\ln(E) = a + b\rho \quad (c)$$

donde  $a$  y  $b$  también son constantes a una temperatura constante. Al sustituir (a) en (c) se obtiene, por último:

$$\ln(xp/p_{ref}) = A + B\rho \quad (d)$$

donde  $A = a + \ln(pv/p_{ref})$  y  $B = b$  son constantes y  $p_{ref}$  es una presión de referencia de 1 bar.

Las curvas obtenidas con (d) por Bartle et al. con base en los datos de Chrástil siguen la misma tendencia de los de Wiebe et al. (citado por Bartle et al., 1991) quienes obtuvieron datos experimentales en el año de 1941 y comprobaron que la solubilidad es altamente dependiente de la  $P$  y la  $T$  de trabajo. Las constantes de  $\rho$  del  $CO_2$  puro en  $gmol/dm^3$  se obtuvieron con una ecuación de estado. El  $CO_2$  se consideró como puro debido a que las solubilidades de las diferentes sustancias, frente a él, resultaron ser muy bajas. Los resultados de Bartle et al. comparados con los de Wiebe et al. se muestran en la Figura 5.2.

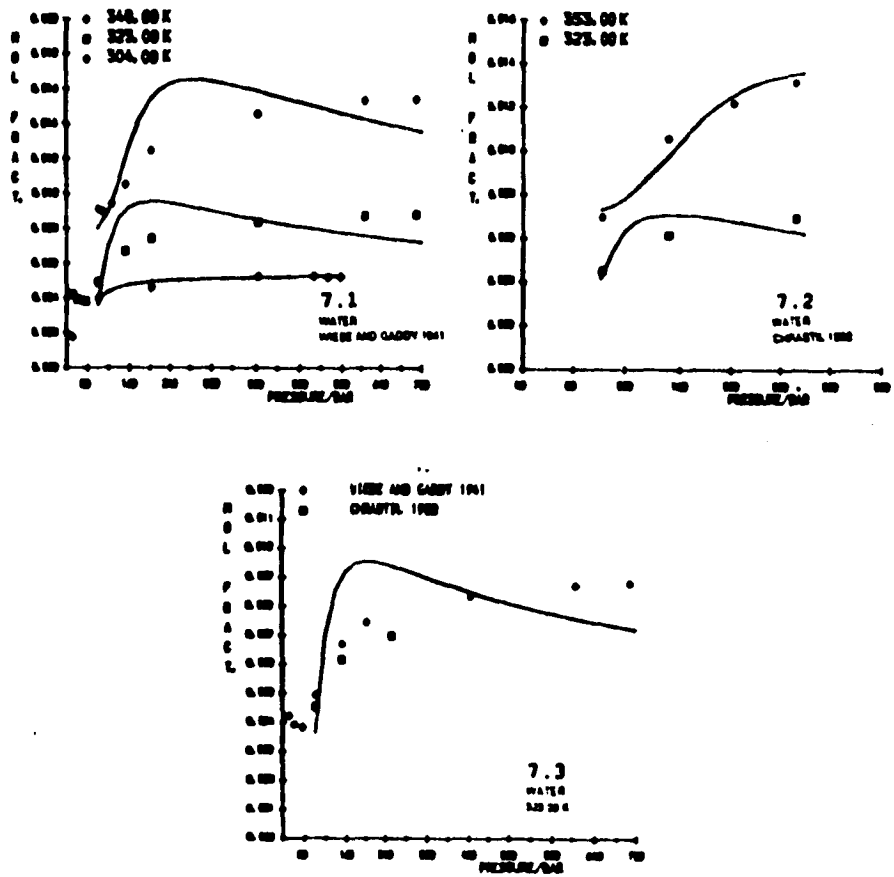


Figura 5.2  
Solubilidad del Agua en CO<sub>2</sub>SC.

Aunque se han utilizado varias ecuaciones de estado (ver Tabla 5a) para modelar el equilibrio líquido-vapor del sistema CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O, no ha sido tarea fácil representar el comportamiento de éste ya que a temperaturas entre los 30 y 50 °C y presiones de 100 atm o mas, no se cuenta con muchos datos; de hecho no se ha podido definir con certeza las fases que coexisten a estas condiciones. Además, por lo mismo, no es fácil determinar los parámetros requeridos para las diferentes ecuaciones de estado debido a la naturaleza tan particular del punto crítico.

van der Waals
$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{V^2}$
Carnahan-Starling-van der Waals
$P = RT \frac{\zeta(1-\zeta+\zeta^2-\zeta^3)}{b(1-\zeta)^3} - \frac{a}{V^2}$
Redlich-Kwong
$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{\sqrt{TV}(V+b)}$
Carnahan-Starling-Redlich-Kwong
$P = RT \frac{\zeta(1-\zeta+\zeta^2-\zeta^3)}{b(1-\zeta)^3} - \frac{a}{T^{1/2}V(V+b)}$
Peng Robinson
$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a(T)}{V(V+b)+b(V-b)}$

Tabla 5a

(tomada de Randolph, 1990)

**CAPITULO 6**

**COMENTARIOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## **COMENTARIOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

### ***Generales:***

Tras haber realizado este trabajo, puedo concluir de manera general, lo siguiente:

Es cada vez mas importante que un estudiante de una carrera profesional tenga una visión mas amplia frente a otras áreas de estudio relativas a su carrera, mas que enfocarse exclusivamente en aspectos inherentes a la misma. Asimismo, considero que hay que fomentar en el alumno la curiosidad por buscar información en otros sectores. En la Universidad, por su naturaleza y construcción, es posible asistir a otras instituciones para obtener información de especialistas; esta permite enriquecer la calidad universal. Por ello, pienso que se debe dar mayor importancia a los trabajos monográficos que impulsan el desarrollo multi e interdisciplinario en carreras científicas como lo es la Ingeniería Química.

### ***Termodinámicas:***

- El papel del agua en la biocatálisis en medios supercríticos es crucial. La humedad óptima depende de las características de la enzima y de la reacción de que se trate. Es por ello que para determinar el grado de hidratación óptimo, es recomendable la experimentación exhaustiva para cada enzima a diferentes concentraciones de agua en cada sistema reaccionante.



- Las propiedades físicas de los FSC tales como la constante dieléctrica, densidad, polaridad, etc., son manipulables al modificar variables como presión y temperatura. Esto confiere una gran versatilidad a dichos fluidos, ya que el número de reacciones posibles en estos medios puede verse incrementado notablemente, creando así vías alternas para la síntesis de productos de interés industrial.
- La tecnología supercrítica puede ser una alternativa para la separación de productos de alto valor agregado donde factores como la termoestabilidad y la pureza requerida son obstáculos para la extracción líquido-líquido y la destilación convencional. Los FSC, en particular el CO<sub>2</sub>, permiten efectuar reacciones a temperaturas de alrededor de 32°C (lo cual evita la denaturalización térmica) y no dejan residuos pues basta con despresurizar el sistema.
- Se tienen que estudiar más a fondo las consideraciones en torno a la transferencia de masa en fluidos supercríticos. Por lo tanto, se deben realizar experimentos a pequeña escala equivalentes al equipo de proceso utilizado en la realidad para entender el mecanismo de este fenómeno.
- Aunque la capacidad disolvente de la mayoría de los fluidos supercríticos es mucho mayor a las de los gases, ésta es de menor magnitud a la alcanzada por varios disolventes líquidos. Esto se traduce en una limitación en cuanto al número posible de reacciones realizables en FSC.

### ***Enzimáticas:***

- El agua inherente a la estructura enzimática es imprescindible para mantener su configuración activa. Aún queda mucho "camino por andar" para conocer con precisión la cantidad de agua necesaria en el microambiente enzimático, así como la relación de ésta con el disolvente.
- La actividad enzimática puede verse afectada tanto por las características físicas del disolvente como por despresurizaciones y cambios en la concentración de las diferentes especies participantes en la reacción. Por lo tanto, se debe estudiar cada reacción por separado para encontrar las condiciones óptimas del biocatalizador.
- Las lipasas han sido las más utilizadas en el campo de investigación de la biocatálisis en medios no acuosos ya que catalizan la mayoría de las bioreacciones de interés industrial.

### ***Económicas:***

El auge que cobraron los FSC a finales de la década de los setentas como consecuencia de publicaciones en las que se enunciaban sus innumerables ventajas no fué muy duradero ya que varias compañías invirtieron grandes cantidades de dinero en proyectos de investigación que - a final de cuentas - no tuvieron éxito. A partir de entonces comenzó una nueva época en la cual se hicieron estudios económicos más reales cuyo resultado fue el esperado: no eran viables frente a los métodos de separación convencionales (extracción líquido-líquido o destilación). Sin embargo, cabe mencionar

que resultaron costosos los procesos en donde se manejan productos biológicos de alto valor agregado y que son difíciles de separar. Tal es el caso del proceso de extracción de la cafeína del café y la extracción del aceite de lúpulo que se realizan en gran escala. Son estas aplicaciones la base para estudiar con mayor detenimiento las características de los fluidos supercríticos y así, ampliar su campo de aplicación.

Como conclusión, se puede decir que actualmente resulta muy cara la tecnología SC ya que los equipos utilizados para lograr altas presiones representan costos de capital elevados. Empero, las cada vez más estrictas leyes ambientales impuestas a los disolventes orgánicos serán un factor de peso que justifique en un futuro el uso de estos fluidos, probablemente sin importar su alto costo, sobre todo como consecuencia de la eliminación de disolventes tales como los clorados. Además, es probable que grandes volúmenes de producción - en base al abatimiento de los costos - hagan posible su aplicación en un mayor número de procesos.

Por último, después de haber realizado este trabajo puedo concluir que el objetivo principal se cumplió debido a que se presenta de manera concisa una breve semblanza, de fácil y rápido acceso, para el lector interesado. Esto se traduce en una ventaja ya que si, por ejemplo, una persona quisiera ahondar en algún tema específico, se puede referir a los artículos aquí analizados.

**CAPITULO 7**

**BIBLIOGRAFIA**

## **BIBLIOGRAFIA**

Aaltonen, O.; Rantakylä, M.; Biocatalysis in Supercritical CO<sub>2</sub>, **CHEMTECH** abril 1991, 240-248.

Algerman, A.; Erkey, C.; Ghoreishi, S.M., Supercritical Extraction of Hexachlorobenzene from Soil, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1992), Vol. 31: 333-339.

Bartle, K.D.; Clifford, A.A.; Jafar, S.A.; Shilstone, G.F. Solubilities of Solids and Liquids in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, (1991), Vol. 20, No. 4: 714-756.

Brady, B.O.; Kao, C.P.C.; Dooley, K.M.; Knopf, F.C.; Gambrell, R.P., Supercritical Extraction of Toxic Organic from Soils, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1987), Vol. 26: 261-268.

Book, L.; Wu, B.; LaMarca, C.; Klein, M.; Paspek, S. Reactions in Supercritical Fluids; **CHEMTECH**, diciembre (1992): 719-723.

Chrastil, J. Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases. *J. Phys. Chem.* (1982), 86: 3016-3021.

Christman, D.D.; Friedrich, J. P.; List, G.R.; Wainer, K.; Bagley, E.B.; Stringfellow, A.C.; Inglett, G.E. Supercritical Fluid Extraction of Dry-Milled Corn-Germ with Carbon Dioxide, *J. Food. Sci.*, (1984) Vol. 49: 229-232.

Curtis, Helena, *Biologia*, Editorial Médica Panamericana, SA de CV, 1990, págs. 194-202.

Debulis, K.; Klibanov, A.M. Dramatic Enhancement of Enzymatic Activity in Organic Solvents by Lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* (1993), Vol. 41: 566-571.

Dooley, K.M.; Kao, C.P.; Gambrell, R.P.; Knopf, F.C., The Use of Entrainers in the Supercritical Extraction of Soils Contaminated with Hazardous Organics, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1987), Vol. 26: 2058-2062.

Dumont, T.; Barth, D.; Corbier, C.; Branlant, G. Enzymatic Reaction Kinetic: Comparison in an Organic Solvent and in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* (1992), Vol.39:329-333.

Gorman, L.; Dordick, J.S. Organic Solvents Strip Water Off Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, (1992), Vol.39:392-397.

Halling, P.J. Effects of Water on Equilibria Catalysed by Hydrolytic Enzymes in Biphasic Reaction Systems. *Enzyme Microb. Technol.*, (1984) Vol.6(11):513-515.

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

Hammond, D.A.; Karel, M.; Klibanov, A.M. Enzymatic Reactions in Supercritical Gases, (1985), Vol. 11: 393-400.

Kamat, S.; Barrera, J.; Beckman, J.; Russell, A.J. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: 1. Optimization of Enzyme Environment. *Biotechnology and Bioengineering*, (1992), Vol. 40: 158-166.

Kamat, S.; Iwaszkewycz, B.; Beckman, E.J.; Russell, A.J. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Supercritical Fluids: Tuning Enzyme Activity by Changing Pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (abril 1993), Vol.90:2940-2944.

Kazandjian, R.Z.; Dordick, J.S.; Klibanov, A.M. Enzymatic Analyses in Organic Solvents, *Biotech. and Bioeng.* (1986) Vol.27(3) marzo: 417-421.

Kim, J.; Dordick, J. Pressure Affects Enzyme Function in Organic Media. *Biotechnol. Bioeng.* (1993), Vol. 42: 772-776.

Langensfeld, J.; Hawthorne, S.; Miller, D.; Pawliszyn, J. Role of Modifiers for Analytical-Scale Supercritical Extraction of Environmental Samples. *Analytical Chemistry*, (marzo 1994), Vol.66, No.6:909-916.

Larson, K.A.; King, M.L. Evaluation of Supercritical Fluid Extraction in the Pharmaceutical Industry, (1986), *Biotechnol. Progress*, Vol.2(2): 73-82.

Martins, J.; de Sampaio, T.; de Carvalho, I.; Berreiros, S. Lipase Catalyzed Esterification of Glycerol in Nonaqueous Solvents: Solvent Effects on Enzymatic Activity (1994) *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44:119-124.

Marty, A.; Chahalokannakul, W.; Condoret, J.S.; Willemot, R.M.; Durand, G. Comparison of Lipase-Catalysed Esterification in Supercritical Carbon Dioxide and n-Hexane (1990) *Biotechnol. Lett.*, 12 (1): 11-16.

Marty, A.; Chahalokannakul, W.; Willemot, R.M.; Condoret, J.S. Kinetics of Lipase-Catalysed Esterification in Supercritical CO<sub>2</sub>. (1992) *Biotechnol. Bioeng.* 39: 273-280.

Marty, A.; Combes, D.; Condoret, J.S. Continuous Reaction-Separation Process for Enzymatic Esterification in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, (1994), Vol.43:497-504.

McHugh, M.A.; Krukonis, V.J. *Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice*, 1st. ed., Butterworths Publishers, Boston, MA, USA.

Nakamura, K. Biochemical Reactions in Supercritical Fluids. *TIBTECH* (1990) Vol.8(9): 288-292.

Page, S.; Sheldon, R.; Lee, M. Fluid Phase Equilibria in Supercritical Fluid Chromatography with CO<sub>2</sub>-Based Mixed Mobile Phases: A Review. *J. Microcol. Sep.* (1992) 4: 91-122.

Pasta, P.; Mazzola, G.; Carrea, G.; Riva, S. Subtilisin-Catalysed Transesterification in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnol. Lett.* (1989), Vol.11(9):643-648.

Randolph, T.W.; Blanch, J.M.; Prussnitz, J.M.; Wilke, C.R. Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid. *Biotechnol. Lett.* (1985) Vol. 7(5): 325-328.

Randolph, T.W.; Clark,D.S.; Blanch,H.W.; Prausnitz,J.M. Enzymatic Oxidation of Cholesterol Aggregates in Supercritical Carbon Dioxide. *Science* (enero,1988), Vol. 238:387-390.

Randolph,T.W.; Blanch,H.W.; Prausnitz,J.M.Enzyme-Catalyzed Oxidation of Cholesterol in Supercritical Carbon Dioxide. *AIChE Journal*, (1988), Vol.34(8):1354-1360.

Randolph,T.W. Supercritical Fluid Extractions in Biotechnology. *TIBTECH*, (1990), Vol.8(3):78-82.

Russell, A.J.; Beckman, E.J. Enzyme Activity in supercritical Fluids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (1991), Vol.31:197-211.

Russell, A.J.; Beckman, E.J. Should the High Diffusivity of a Supercritical Fluid Increase the Rate of an Enzyme-Catalyzed Reaction? *Enzyme Microb. Technol.*, (dicembre 1991), Vol.13: 1007.

Russell, A.J. Studying Enzyme Activity in Supercritical Fluids. *CHEMTECH*, (marzo,1994): 33-37.

Skriva-Alexopoulos,E.; Muir,J.; Freedman,R.B. Stability of Bilirubin Oxidase in Organic Solvent Media: A Comparative Study on Two Low-Water Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, (1993), Vol.41:894-899.

Svensson,I.; Wehtje,E.; Adlercreutz,P.; Mattiasson,B. Effects of Water Activity on Reaction Rates and Equilibrium Positions in Enzymatic Esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, (1994), Vol.44: 549-556.

Taniguchi,M.; Tsuji,T.; Shibata,M.; Kobayashi,T. Extraction of Oils from Wheat Germ with Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Food Science*, (1985) Vol.49(8):2367-2372.

Taniguchi, M.; Kamihira, M.; Kobayashi, T. Effect of Treatment with Supercritical Carbon Dioxide on Enzymatic Activity. *Agric. Biol. Chem.* (1987) Vol. 51(2): 593-594.



**Taniguchi,M.; Nomura, R.; Kijima,I.; Kobayashi,T. Preparation of Defatted Mustard by Extraction with SCCO<sub>2</sub>,(1987) Agric. Biol. Chem., Vol.51(2): 413-417.**

**Taylor,L.T. Supercritical Fluid Extraction/Chromatography, ACS Short Courses, Am. Chem. Soc., Washington, D.C., USA, Capítulo 1: "Introduction to Supercritical Fluids".**

**Tomkow,K.; Siemieniowska,T; Albizak,A.; Kaczmarczyk,J. Influence of the Supercritical Toluene Extraction of Brown Coals on the Development of Porosity during Carbonization and Steam Gasification, Energy and Fuels (1988), Vol. 2: 246-252.**

**Valentinotti, S. Estabilidad Enzimática en FSC. Tesis Ing.Quím. Facultad de Química, UNAM (1992) 45h.**

**Valivety,R.H.; Johannes,L.; Rakols,L.; Blanco,R.M. Johnston,G.A.; Brown,L.; Suckling,C.J.; Halling,P.J. Measurement of pH Changes in an Inaccessible Aqueous Phase during Biocatalysis in Organic Media. Biotechnol. Lett. (1990), Vol.12(7):475-480.**

**Vasilakos,N.P.; Dobba,J.M.; Parisi,A.S. Solvent Effects in Supercritical Fluid Extraction of Coal, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., (1985), Vol.24: 121-128.**

**Via J.; Taylor,L.T. Solving Process Problems with Supercritical Fluid Extraction. CHEMTECH, noviembre (1993): 38-44.**

**Vieville,C.; Mouloungui,Z.; Gassot,A. Esterification of Oleic Acid by Methanol Catalyzed by p-Toluenesulfonic Acid and the Cation Exchange Resins K2411 and K1481 in Supercritical Carbon Dioxide. Ind. Eng. Chem. Res., (1993), Vol. 32: 2065-2068.**

**Yokozeki,K.; Yamazaki,S.; Takinami,K.; Hirose,Y.; Tanaka,A.; Sonomoto,K.; Fukui,S. Application of Immobilized Lipase to Regio-Specific Interesterification of Triglyceride in Organic Solvent. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1982), Vol.14:1-5.**

**Young,M.C.; Nakamura,K.; Toshimasa,Y. Enzymatic Interesterification in Supercritical Carbon Dioxide. Agric.Biol.Chem. (1988), Vol.52(6): 1541-1550.**

Zaks A.; Klivanov,A.M. Enzymatic Catalysis in Organic Media. Science (1984), Vol.224: 1249-1251.

Zaks, A.; Klivanov, A.M. Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. J. Biol. Chem. (1988) Vol. 263(7): 3194-3201.

### REFERENCIAS

Ayala,G.; de Gómez-Puyou,M.T.; Gómez-Puyou,A.; Darazon,A. FEBS Lett., (1986), Vol. 203: 41-43.

Cesti,P.; Zaks, A.; Klivanov,A.M. Appl. Biochem. Biotechnol., (1985), Vol.11: 401-407.

Chi,Y.M.; Nakamura,K.; Yano,T., Agric.Biol.Chem., (1988), Vol. 52(6):1541.

Kasche,V.; Schlothauer,R.; Brunner,G. Biotechnol. Lett., (1988), Vol. 10(8):569.

Kirchner,G.; Scollar,M.P.; Klivanov,A.M., J.Am.Chem.Soc.,(1985), 107:7072-7076.

Klivanov,A.M.,CHEMTECH, (1986), Vol.16:354-359.

Luisi,P.L., Angew.Chem.Int.Ed. Engl. (1985),Vol.24:439-450.

Martinek,K.; Levanov,A.V.; Klyachko,N.; Khmelnitaki,Y.L.; Berezin,I.V., Eur. J. Biochem.,(1986), Vol.155:453-468.

Nakamura,K.; Chi,Y.M.; Yamada,Y.; Yano,T., Chem.Eng. Commun., (1986), Vol.45: 207.

Therisod,M.; Klivanov,A.M. J.Am.Chem.Soc., (1986), Vol.108:5638-5640.

Therisod,M.; Klivanov,A.M. J.Am.Chem.Soc., (1987), Vol.109:3977-3981.

van Eijs, A.M.M.; de Jong, J.P.J.; Oostrom, H.M.M.; Doddema, H.J.; Visser, M.A.; Stoop, R.,  
Proceedings of the Second Netherlands Biotechnology Congress; Amsterdam,  
Oct., (1988):20-21.

Waku, M., Proteins: Struct.Funct.Genetics, (1986),1: 4-15.

Wheeler, C.J.; Croten, R. Arch. Biochem. Biophys., (1986), Vol.248:429-434.