



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ADSORCION DE LUTEINA Y SUS DIESTERES
SOBRE SOPORTES DE LIPASAS COMERCIALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SOFIA MORAN RAMOS



MEXICO, D.F.



2005

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

m. 349432



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Eduardo Bázana García

Vocal: Raúl Aguilar Caballero

Secretario: Maria de los Ángeles Valdivia

1er Suplente: Hermilo Leal

2do Suplente: Agustín Reyó

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, Ciudad Universitaria

Asesor del Tema:

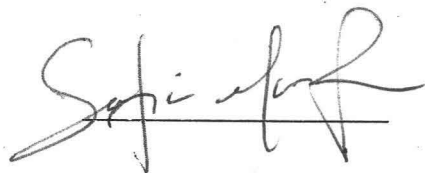
Dr. Eduardo Bázana García



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Bázana', written over a horizontal line.

Sustentante:

Sofía Morán Ramos



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sofía Morán Ramos', written over a horizontal line.

A mis padres, por la paciencia, el apoyo, el cariño y la comprensión que siempre han mostrado. Por enseñarme que la disciplina es esencial en la vida y que el *conocimiento* es la razón de ella.

A Mariana por ser siempre una dulce compañía, una amiga y una ayuda para mí.

A Luis por ser un amigo, un apoyo en todo momento y por mostrarme que la vida debe tomarse siempre con una sonrisa.

A mis amigas por compartir conmigo.

A los chicos del laboratorio por ayudarme durante el desarrollo de este trabajo.

A todos aquellos que ya no están conmigo pero que ayudaron a la culminación de esta etapa.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM
- A la Facultad de Química y al programa 127, por ser parte fundamental en mi formación profesional.
- A Eduardo por compartirme un poco de su conocimiento, por la paciencia y por la ayuda.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
1. GENERALIDADES	5
1.1 Carotenoides	5
1.1.1 Xantofilas	5
1.1.2 Solubilidad	6
1.1.3 Actividad Biológica	6
1.1.4 Principales fuentes	7
1.1.5 Obtención de luteína	8
1.1.6 Estructura base y características asociadas	9
1.2 Lipasas	10
1.2.1 Lipasas en medios no acuosos	11
1.2.2 Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	15
1.2.3 Lewatit VP OC 1600	16
1.3 Actividad acuosa	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y METODOS	21
4.1 Materiales	21
4.1.1 Soportes	21

4.1.2	Compuestos	21
4.1.3	Equipos	21
4.2	Métodos	22
4.2.1	Condiciones generales de reacción	22
4.2.2	Ajuste y medición del Aw	23
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1	Medición de carotenoides adsorbidos	24
5.2.1	Cinética de desaparición de diésteres de luteína	29
5.2.2	Cinética de desaparición de luteína libre	30
6.	CONCLUSIONES	37
7.	REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	39

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN

En la actualidad, los carotenoides han adquirido gran importancia comercial como colorantes naturales. Tal es el caso de la luteína a la cual también se la ha denominado como nutracéutico pues su consumo esta asociado a la prevención del envejecimiento de la macula del ojo.

Industrialmente, la luteína proveniente de la flor de cempasúchil puede ser obtenida por una extracción con solventes y posteriormente una saponificación para liberarla de su forma esterificada. La propuesta del grupo de trabajo, ha sido llevar a cabo la extracción con hexano en conjunto con la desesterificación enzimática.

Estos estudios han demostrado que la reacción enzimática de hidrólisis de diésteres de luteína en hexano con Novozym 435 (lipasa B de *Candida antarctica*) esta influenciada por el A_w , siendo los valores bajos, los que favorecen la reacción. Por otro lado se ha observado que hay una interacción marcada entre el colorante y la superficie que da soporte a la lipasa.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la actividad acuosa sobre la adsorción de luteína y sus derivados así como la afinidad que estos muestran por el soporte de la lipasa.

Los resultados de este estudio muestran que la luteína presenta una mayor afinidad por el soporte que el diéster de luteína, ya que el nivel de adsorción de luteína alcanza hasta un 60% mientras que para el diéster no rebasa el 30%. Esta afinidad, extrapolada a la reacción enzimática podría verse asociada con un fenómeno equivalente a la inhibición por producto.

Por otro lado, los experimentos realizados a valores extremos de A_w (0.1 y 0.9) muestran que para el soporte de Novozym 435, el A_w no ejerce un efecto considerable sobre los niveles de adsorción de la luteína y sus derivados. Sin embargo, este comportamiento no se puede extrapolar a la reacción enzimática pues la enzima libre podría presentar un comportamiento diferente por lo que se considera necesario realizar estudios directos del efecto del A_w sobre la enzima libre.

INTRODUCCION

Durante las últimas décadas el interés por los procesos biotecnológicos se ha incrementado de manera considerable y sus áreas de aplicación se han ampliado a muchos aspectos de la vida cotidiana y la actividad económica en diversos sectores. Su importancia no solo tiene que ver con la disminución de costos y mejoramiento de los procesos industriales y agrícolas, sino también con el mejoramiento del medio ambiente y la salud de los seres humanos.

Un ejemplo de este tipo de desarrollos biotecnológicos es el de los colorantes provenientes de fuentes naturales, como es el caso de la luteína, la cual ha tenido en México un amplio mercado, debido a su utilidad como pigmentante de pollos y yema de huevo (Hencken H. 1992). El estudio y mejoramiento de los procesos de obtención de la luteína ha cobrado mayor importancia por sus propiedades antioxidantes, las cuales se han reconocido como ayuda para disminuir afectaciones en la mácula del ojo y por lo tanto la disminución de la vista en personas de edad avanzada.

El proceso comercial de extracción de luteína con hexano a partir de flores de cempasúchil se lleva a cabo por un procedimiento de múltiples pasos que incluye una saponificación para liberar a la luteína de su forma diesterificada presente en la flor. Como alternativa y mejora, un proceso enzimático de desesterificación llevado a cabo simultáneamente a la extracción, permitiría lograr una extracción más limpia y en menos pasos (Bárzana-García, E., 2002).

Investigaciones del grupo de trabajo en los últimos cinco años muestran la posibilidad de realizar la desesterificación en el medio orgánico de extracción y

de manera particular con la fracción B de la lipasa de *Candida antarctica*, utilizada en su forma comercial inmovilizada conocida como Novozyme 435™.

Para poder entender mejor la cinética de la reacción, se han realizado diversos estudios observando los efectos tanto del A_w en el sistema, como de solventes de diferentes polaridades. Estos estudios, basados en las propiedades de las enzimas inmovilizadas en una gran cantidad de soportes y con diferentes características, sugieren que el soporte en si juega un papel importante en la interacción enzima-sustrato y, por lo tanto, en el progreso de la reacción. En particular la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína se ve progresivamente inhibida al incrementarse el A_w del sistema. En virtud de que el agua es también sustrato de la reacción, resulta meritorio conocer el mecanismo de esta inhibición poco usual en reacciones de hidrólisis.

Con base en lo anterior se decidió llevar a cabo de manera general un estudio que permitiera conocer con mayor precisión la interacción por adsorción del soporte (utilizado en Novozyme 435) con los sustratos y productos a diferentes valores de A_w , y determinar en que medida esta interacción afecta a la cinética de la reacción. De manera más específica, se buscó saber si existe una dependencia entre el A_w y la interacción con los sustratos, tomando en cuenta que por estudios previos en el grupo de investigación, el A_w juega el papel más importante entre de los factores que afectan la reacción de desesterificación de la luteína.

1. GENERALIDADES

1.1. CAROTENOIDES

Los carotenoides son los pigmentos naturales de mayor presencia en la naturaleza después de la clorofila y se dividen en dos grupos; los carotenos y las xantofilas. Estos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el reino animal como el vegetal. La estructura básica de todos los carotenoides está conformada por un esqueleto isoprenoide y de naturaleza lipofílica con un característico color que puede ir del rojo intenso al amarillo.

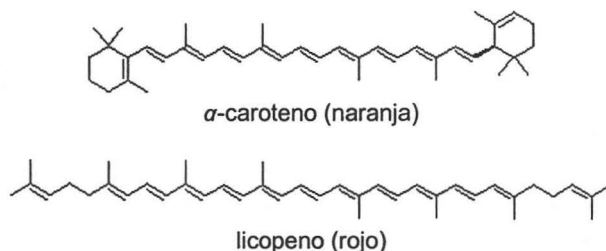


Figura 1: Estructuras de carotenoides representativos

1.1.1 Xantofilas

Las xantofilas son carotenoides que además de carbono e hidrógeno incluyen en su estructura molecular átomos de oxígeno. Se diferencian de los carotenos en que uno o ambos anillos están hidroxilados (monohidroxi-, dihidroxi- y polioxipigmentos), lo que hace posible la esterificación del carotenoide con uno o dos ácidos grasos. Esta derivatización afecta su disponibilidad biológica, así como el poder pigmentante, de la molécula base.

1.1.2 Solubilidad

En general los carotenoides son no polares, propiedad que varia según la estructura. Por ende, son altamente solubles en solventes orgánicos como acetona, cloroformo, acetato de etilo y hexano entre otros. Esta característica permite su extracción con este tipo de solventes, a partir de fuentes naturales.

1.1.3 Actividad biológica

Es conocido que tanto en plantas como en animales y humanos la luteína funciona de dos maneras importantes: como filtro de la luz azul de alta energía y como antioxidante, esto último por su alta capacidad para remover el oxígeno reactivo inducido por la luz. De esta manera, investigaciones médicas recientes sugieren que el consumo de luteína previene la degeneración de la mácula del ojo provocada por el envejecimiento así como las cataratas (Alves-Rodrigues y Shao, 2004). Todo esto basado en que la luteína, junto con su esteroisómero la zeaxantina, se encuentran en concentraciones altas en la mácula del ojo, área de la retina responsable de la visión central. Esto ha provocado que la producción u obtención de luteína de alta pureza cobre cada vez más importancia, especialmente porque en la actualidad se le ha conferido el calificativo de nutraceutico.

Así mismo, las xantofilas, como se mencionó anteriormente, son las responsables del color de la yema de huevo y de la carne en pollos, lo que justifica su aplicación por décadas en la formulación de dietas usadas en la industria avícola.

1.1.4 Principales fuentes

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, e imparten a flores o frutos un color naranja característico como la flor de cempasúchil y las zanahorias entre otras. La distribución de carotenoides representativos en algunos productos vegetales se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de carotenoides en productos vegetales (Holden, J.M., et.al. 1999)

Contenido de carotenoides en algunas frutas y verduras			
Alimentos	Caroteno	Licopeno	Luteína/ Zeaxantina
Brócoli	779	-	2,445
Coles de Bruselas	450	-	1,590
Col	65	-	310
Zanahorias	7,275	-	358
Maíz	30	-	884
Ejotes	377	-	640
Uva morada	603	1,462	13
Coliflor	9,226	-	39,550
Hojas de lechuga	1,272	-	2,635
Naranjas	51	-	187
Papaya	276	-	75
Chícharos	320	-	1,350
Espinaca	55,597	-	11,938
Jitomates	393	3,025	130

Unidades: $\mu\text{g}/100 \text{ g}$. Departamento de Agricultura EUA (1998).

Las principales fuentes de xantofilas empleadas por la avicultura en México son aquellas provenientes de la flor de cempasúchil y de los chiles del género *Capsicum*. También se utilizan pigmentos obtenidos por síntesis química como la cantaxantina, pero los mercados tienden constantemente a un mayor uso de productos naturales.

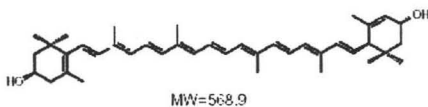
De todas las posibles fuentes vegetales, se ha determinado que los pétalos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), son la fuente de mayor concentración

de xantofilas (6,000 – 10,000 mg/kg. de harina de pétalos) (Philip y Berry, 1975). La luteína representa mas del 60% de las xantofilas en la harina y se encuentra en la naturaleza diacilada con los ácidos grasos, láurico, mirístico, palmítico o esteárico (Breithaupt, D., 2002 y 2003). Esta planta es originaria de México y se cultiva en zonas como Michoacán, Sinaloa y Guanajuato, alcanzando producciones de hasta 30 toneladas por hectárea (Martínez-Peña et. al, 2004).

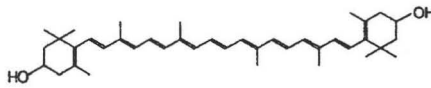
1.1.5 Obtención de luteína

El proceso tradicional para la obtención de xantofilas se inicia con la cosecha estacional. De ahí se lleva a cabo un ensilado y posteriormente un proceso de prensado, deshidratación, molienda y paletizado de la harina de la flor, la cual se lleva a un extractor (con solventes) para obtener una oleoresina que contiene carotenoides esterificados y otros liposolubles de la flor. El bagazo residual es desechado o empleado en la formulación de dietas para aves. La oleoresina es finalmente saponificada (hidrólisis alcalina) para obtener a las xantofilas (luteína y zeaxantina entre otras) en su forma libre (Matoushek, 1974).

En la figura 2 se muestran las estructuras de la luteína y su isómero donde se observa la posición de los grupos hidroxilo:



Luteína



Zeaxantina

Figura 2: Estructuras de luteína y su isómero la zeaxantina.

1.1.6 Estructura base y características asociadas

El sistema de dobles ligaduras (polieno) constituye el grupo cromóforo que le da a los carotenoides su color característico y que permite obtener un espectro de absorción que es la base para su identificación y cuantificación. Sin embargo este sistema también es responsable del carácter antioxidante y de su inestabilidad pues las dobles ligaduras son muy sensibles a la oxidación. La luz, el calor y la adsorción sobre ciertas superficies pueden inducir este proceso lo que provoca la pérdida de su color característico. Es entonces claro que la pérdida de color en todo momento indica una modificación estructural oxidativa. Cabe mencionar que dentro de los carotenoides se han encontrado niveles de susceptibilidad a la oxidación y la luteína es considerada como uno de los primeros lugares (Rodríguez-Amaya, D., 2001).

El espectro característico de la luteína se muestra en la figura 3:

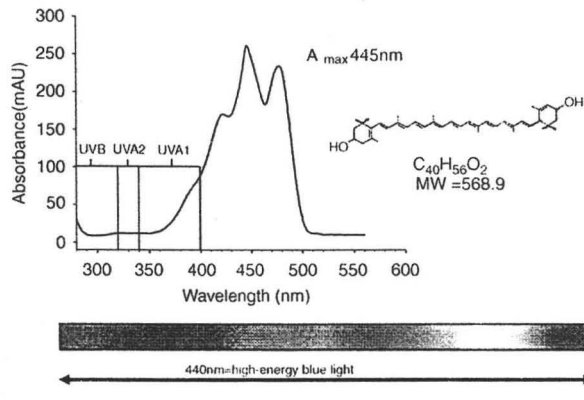


Figura 3: Barrido espectrofotométrico de la luteína

1.2 LIPASAS

Las lipasas son enzimas clasificadas como triacilglicerol acilhidrolasas, es decir que catalizan la hidrólisis (y síntesis) de ésteres de glicerol con ácidos grasos de cadena larga. Las lipasas son muy comunes en la naturaleza, sin embargo para propósitos industriales las de origen microbiano son utilizadas mayoritariamente.

Algunos ejemplos de lipasas microbianas se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 2: Ejemplos de lipasas comerciales

Tipo	Fuente	Aplicación
Fúngicas	<i>C. rugosa</i>	Síntesis orgánica
	<i>C. antarctica</i>	Síntesis orgánica
	<i>T. lanuginosa</i>	Aditivo para detergentes
	<i>R. miehei</i>	Procesamiento de alimentos

Bacterianas	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica
	<i>P. alcaligenes</i>	Aditivos para detergente
	<i>P. mendocina</i>	" "
	<i>Ch. viscosum</i>	Síntesis orgánica

En la actualidad la aplicación de las lipasas en la industria de los alimentos y en sus diferentes formas es muy amplia y cubre desde hidrólisis o transesterificación de grasas y aceites, hasta potenciadores de sabor en alimentos procesados (Sharma R., y Yusuf Ch., 2001).

1.2.1 LIPASAS EN MEDIOS NO ACUOSOS

El uso de medios no acuosos para reacciones enzimáticas presenta actualmente grandes ventajas puesto que la solubilidad de algunos de los compuestos de naturaleza lipofílica los convierte en sustratos potenciales en reacciones biocatalíticas de interés comercial.

Por otro lado, la recuperación de productos puede ser desde una perspectiva de procesamiento más sencilla, por una simple evaporación del solvente. Asimismo en algunos casos el uso de este tipo de medios puede incrementar la termoestabilidad del biocatalizador (vs. medios acuosos).

Para el caso de reacciones de hidrólisis en medios orgánicos, la actividad acuosa (A_w) determina, por un lado, la dirección de la reacción y, por otro, el grado de conversión (Vermue, M.H., 1995). En general, se ha determinado que a bajas concentraciones de agua, o incluso sin agua, se llevan a cabo reacciones de síntesis (esterificaciones y transesterificaciones), mientras que

las reacciones de hidrólisis se ven favorecidas, de acuerdo a la ley de acción de masas, en presencia de un exceso de agua, que en estos casos actúa también como sustrato. Sin embargo, estudios recientes para diferentes reacciones catalizadas por lipasas, han mostrado la existencia de perfiles muy variados en función del A_w . Algunas lipasas muestran un claro aumento de actividad a valores altos de A_w y, en otros casos, se observa un perfil tipo campana.

Por otro lado, se tiene que para enzimas inmovilizadas en un soporte sólido, este perfil también se puede ver afectado por otros factores, los cuales se han clasificado de la siguiente manera:

1. Indirectos:

1.1 Efectos de partición de sustratos y productos

1.2 Efectos de partición del agua, íntimamente relacionados con el A_w

2. Directos:

2.1 Inactivación parcial de la enzima durante la inmovilización

2.2 Efectos no específicos del soporte en la actividad de la enzima.

1.1 El soporte puede influenciar de manera indirecta la partición de sustratos y productos, por medio de la alteración del microambiente generado entre la enzima y el solvente. Esto generalmente se puede deber a la carga neta del soporte, o bien por su polaridad, la cual puede afectar las reacciones en ambientes hidrofóbicos o hidrofílicos (Adlerkreutz, P., 1991).

1.2 Como se mencionó anteriormente en este tipo de ambientes, en donde se usan solventes orgánicos como medio, el A_w juega un papel muy importante. Esto es porque la enzima para estar activa necesita un nivel mínimo de agua. Sin embargo estudios realizados han mostrado que la afinidad del soporte por el agua o del mismo solvente pueden entrar en competencia de manera que la eficiencia de la enzima disminuya (Valivety R., y Halling P.J., 1994). Esto es que aun a valores preestablecidos de A_w , la disponibilidad de agua puede variar provocando que la actividad de una enzima se vea influenciada por el soporte.

Algunos perfiles reportados para *Candida rugosa* y *Pseudomonas sp.* en diferentes reacciones (esterificación, hidrólisis y transesterificación) se muestran a continuación (Wehtje y Adlercreutz, 1997).

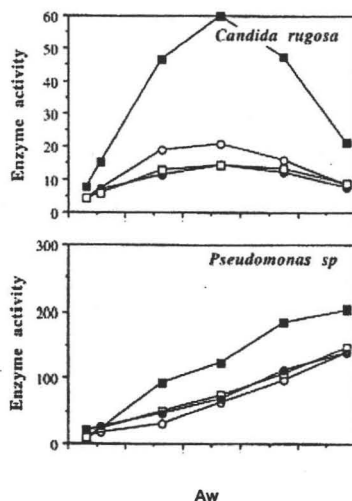


Figura 4: Actividad enzimática encontrada para *Pseudomonas sp.* y *Candida rugosa* en función del A_w para cuatro diferentes reacciones; esterificación (■), hidrólisis de dodecil decanoato (○), transesterificación (●) e hidrólisis de etil decanoato (□).

Estudios previos del grupo de investigación relacionados con la hidrólisis de diésteres de luteína mediada por lipasa B de *Candida antarctica* han demostrado que las mayores velocidades de reacción ocurren a bajos A_w (<0.15) y con un perfil inusual a los previamente reportados. (Mora-Pale y Bázquez, 2005)

Asimismo, se ha observado una intensa coloración naranja en la superficie del biocatalizador al finalizar la reacción. Estas observaciones presuponen que la adsorción de sustratos y/o productos afectan el progreso de la reacción y que dicha interacción depende del A_w del sistema.

1.2.2 Lipasa Candida Antarctica B

El presente estudio está basado en los resultados obtenidos para la hidrólisis de diésteres de luteína empleando el biocatalizador comercial Novozym 435 (donado por Novo de México).

Este biocatalizador es una forma comercial de la fracción B de la lipasa proveniente de *Candida antarctica* y se encuentra soportada en una resina comercial de ésteres metacrílicos llamada Lewatit VP OC 1600 (donada por Lanxess-Bayer de México).

La estructura molecular de la enzima se presenta en la figura 5:

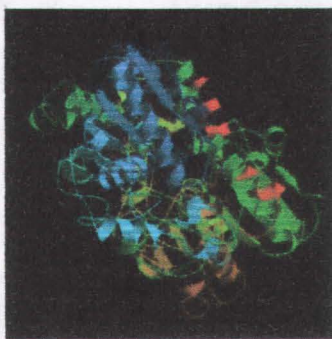


Figura 5: Estructura de la lipasa B de *Candida antarctica* (Uppenberg, J., 1994)

La forma inmovilizada le proporciona a la lipasa una gran estabilidad térmica en comparación con la forma libre, lo que permite trabajar a temperaturas altas, siendo la estabilidad del sustrato la única limitante por los problemas de oxidación previamente mencionados.

En la figura 6, se muestra una micrografía electrónica de la lipasa comercial (Laboratorio de Microscopía electrónica de la USAI. Facultad de Química) que da cuenta de una superficie seca poco rugosa y una geometría esférica de aproximadamente 300 μm .

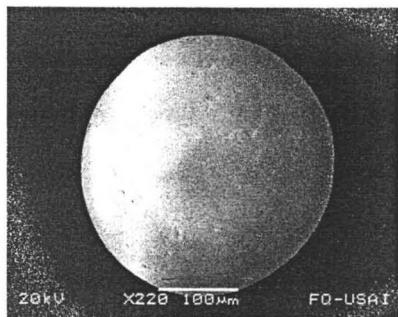


Figura 6: Micrografía electrónica de Novozym 435, tomada en el laboratorio de la USAI

1.2.3 Lewatit VP OC 1600

Esta es una resina macroporosa (polímero en esferas), elaborada a base de esteres metacrílicos y entrecruzada con divinilbenceno (DVB). Las características básicas de esta resina son las siguientes:

Tabla 3: Características fisicoquímicas de Lewatit VP OC 1600.

Forma iónica	neutra
Grupo funcional	ninguno
Matriz	Metacrilato entrecruzado
Diámetro de poro	15 nm
Volumen de poro	0.5 mL/g
Área superficial	130m ² /g

Gracias a estas características, la resina tiene una alta capacidad adsorbente bifuncional, tanto de agua como de solventes y funciona como excelente soporte para enzimas.

1.3 ACTIVIDAD ACUOSA (A_w)

La actividad de agua esta definida como la relación de la presión de vapor de un material y la presión de vapor del agua pura, ambos a la misma temperatura.

$$A_w = P/P_0$$

El A_w también es una medida del estado energético del agua en el sistema. El agua generalmente esta unida a los materiales por fuerzas de diferentes magnitudes que se fundamentan en su capacidad para formar puentes de hidrogeno. Es por eso que algunas veces la actividad acuosa ha sido definida como el agua disponible del sistema. Sin embargo, este término para algunos casos puede ser difícil de conceptualizar.

El A_w es función de la temperatura, es decir, que al variar la temperatura varía la fuerza con las que están unidas las moléculas, incluida la participación del agua y la solubilidad de algunos compuestos en ésta.

Generalmente se mide bajo condiciones estáticas de equilibrio, dado que bajo esas condiciones la presión de vapor de agua en la superficie del producto sería igual a la presión de vapor de agua en el ambiente inmediato a éste. Cualquier cambio entre la humedad del producto y su ambiente se dará por una diferencia entre presiones.

Se ha determinado que el A_w afecta de manera importante la actividad biológica por lo que es ampliamente empleado en sistemas alimentarios para el control microbiano y de diversas reacciones de deterioro. Por lo mismo, y

según se menciono previamente, la actividad enzimática "in vitro" es también dependiente del A_w .

2. JUSTIFICACION

En los últimos años se ha presentado dentro de la biotecnología un desarrollo importante en el estudio de procesos enzimáticos en medios orgánicos y fluidos supercríticos para la extracción y modificación de colorantes naturales. Estos estudios han generado, a la fecha, resultados prometedores. Es por lo tanto necesario conocer a profundidad el sistema completo de la reacción.

En particular, se ha visto que para la hidrólisis de diésteres de luteína existe una interacción marcada entre el colorante, y la superficie que da soporte a las lipasas comerciales empleadas. Esta interacción resulta de interés para el caso del sustrato, pero puede ser causa también de una importante inhibición al acumularse producto en la vecindad de la enzima. Adicionalmente, esta interacción podría verse afectada por los niveles de agua en el sistema.

En primera instancia, el objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología confiable que permita monitorear los niveles de adsorción del sustrato en el soporte, para así poder determinar la afinidad de los compuestos que intervienen en la reacción de hidrólisis enzimática de diésteres de luteína y, por otro lado, medir la influencia de la actividad acuosa sobre la adsorción de estos y su efecto en la reacción global.

HIPOTESIS

La hidrólisis de diésteres de luteína en Novozyme 435 ocurre preferentemente a bajos valores de A_w debido a que esta condición favorece la adsorción del sustrato. Sin embargo, la adsorción concurrente del producto (luteína libre) en la vecindad de la enzima puede llevar a un efecto indirecto o equivalente de inhibición por producto.

3. OBJETIVO

Objetivo General

Determinar el efecto de la actividad acuosa sobre la adsorción de luteína y sus derivados basado en evidencias experimentales que demuestran un importante efecto del Aw en reacciones enzimáticas asociadas.

Objetivos particulares:

- Determinar una metodología confiable para la medición de la adsorción de diésteres de luteína y luteína por el soporte del biocatalizador (Lewatit)
- Establecer si es posible medir la adsorción de sustrato o producto en el biocatalizador por espectrofotometría de reflectancia en superficies sólidas.
- Determinar la afinidad relativa o selectividad de adsorción de las especies que intervienen en la reacción de hidrólisis de luteína por el soporte del biocatalizador.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1 Soportes:

- La resina Lewatit VP OC 1600, cuyas características se enlistan en los antecedentes fue amablemente donada por la compañía Lanxess-Bayer de México.
- Alúmina neutra grado1, adquirida de la compañía Sigma.

4.1.2 Compuestos

- Diésteres de luteína: Se trabajó con un concentrado al 80% de diésteres de luteína (Xantopina Plus) proporcionado por la compañía Bioquimex Natural S.A. de C.V.
- Luteína: Se utilizó una forma comercial, adquirida en GNC con un contenido de 20 mg por cápsula, la cual se separó de la mayoría de sus impurezas por medio de un tamiz.

4.1.3 Equipos:

Incubadora: Innova (New Brunswick)

Medidor de Aw: Rotronic Hygrometer C94

Espectrofotómetro: Perkin Elmer Lambda 2 UV/Visible acoplado con un accesorio de medición de reflectancia RSA-PE-20

HPLC; modelo Hewlet Packard 1600

4.2.1 CONDICIONES GENERALES DE REACCION

El diagrama experimental general se muestra en la figura 6:

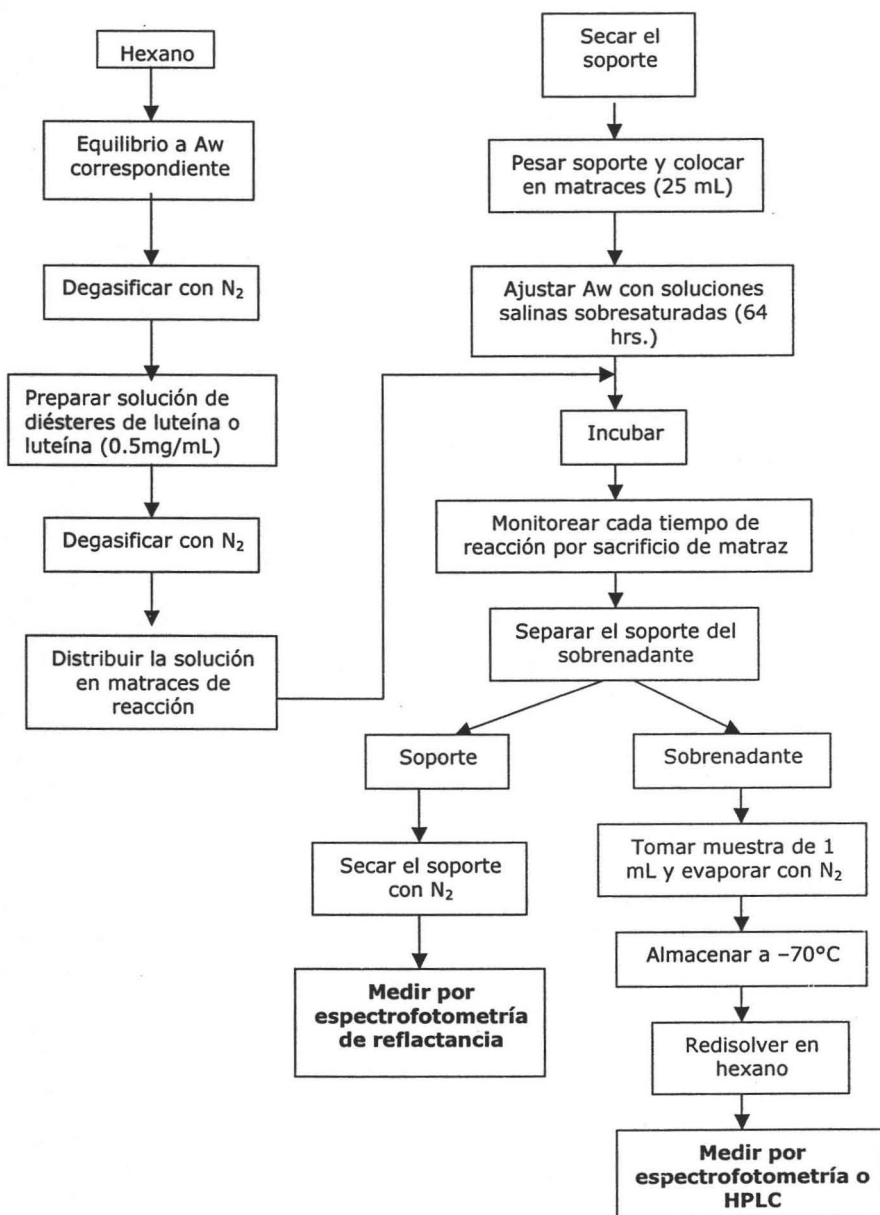


Figura 6: Diagrama de flujo de la metodología general de trabajo

La metodología general que se uso así como las condiciones generales fueron previamente establecidas por Mora-Pale y Bárzana (2003).

Los parámetros generales son los siguientes;

Solución de diésteres de luteína en hexano concentración = 0.5 mg/mL

Temperatura de incubación = 60°C

Agitación de matraces = 130 rpm

En todos los casos las muestras se corrieron por duplicado.

4.2.2 Ajuste y medición del Aw

Para lograr el valor de Aw deseado, el soporte se preequilibró en un desecador durante 60 horas al vacío, en presencia de soluciones salinas para preestablecer dos valores extremos de Aw, según se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Soluciones que ajustan diferentes valores de Aw

Solución salina	Aw
LiCl	0.113
KNO ₃	0.936

El alcance del equilibrio y la confirmación del Aw final en diferentes muestras fueron establecidos mediante mediciones en el medidor de Aw: Rotronic.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MEDICIÓN DE CAROTENOIDES ADSORBIDOS

Para la medición de la adsorción de carotenoides se desarrollaron dos diferentes metodologías:

- A. Medición directa de carotenoides adsorbidos sobre los soportes por la técnica de reflectancia.
- B. Medición indirecta por disminución de concentración de carotenoides en solución.

A. Medición directa de carotenoides adsorbidos sobre el soporte

Para el desarrollo de esta metodología se utilizó un espectrofotómetro Lambda II, al cual se le acopló un aditamento de medición de color por reflectancia. Una vez acondicionado el equipo, se pusieron a prueba dos procedimientos para medir el color en los soportes, las cuales fueron:

- Elaboración de pastillas por compactación
- Empacado del soporte en celdas de vidrio

En el caso de las pastillas, éstas no solo mostraron poca cohesividad, sino que también al estar en contacto con hexano se expandieron provocando una rápida desagregación. Por otro lado, el empacado en celdas de vidrio mostró ser mucho más confiable, pues al tratarse de partículas tan pequeñas, éstas se acomodaban de tal manera que la superficie en la que incidía el haz de luz presentaba una uniformidad adecuada.

Una vez elegido el tratamiento de la muestra, se realizaron pruebas para determinar si se presentaba el mismo perfil característico de los diésteres de luteína obtenido en solución para el caso en que se encontraran adsorbidos sobre la resina. El espectro obtenido se muestra en la figura 7.

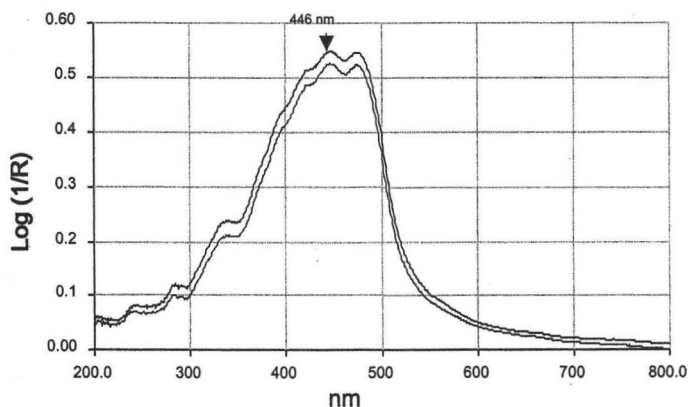


Figura 7: Espectro de los diésteres de luteína adsorbidos sobre Lewatit VP OC 1600

Como se puede observar, el espectro muestra una absorción máxima característica de los carotenoides a 446 nanómetros y corresponde al perfil típico de los diésteres de luteína en solución de hexano.

Una vez observado y comprobado el espectro, se realizaron pruebas para determinar la cinética de adsorción de los diésteres de luteína y luteína libre en soportes equilibrados a dos valores extremos de A_w ; 0.1 y 0.9.

Para estos experimentos se tomó como base la metodología general, pero una vez separados la resina y el sobrenadante, la primera se secó con nitrógeno, se colocó en celdas de vidrio y se midió por espectrofotometría de reflectancia.

Las variaciones con el tiempo se presentan en las figuras 8 y 9.

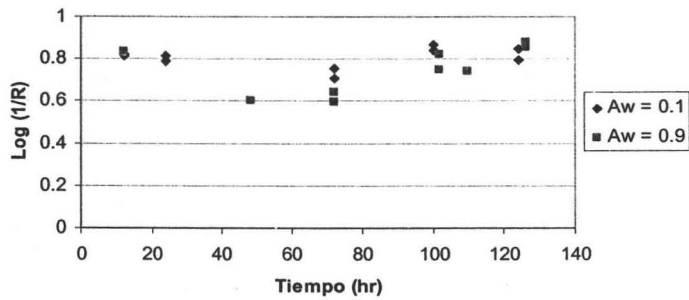


Figura 8: Cinética de adsorción de diésteres de luteína en Lewatit

En la grafica 8, se observa que la mayor adsorción de diéster se da en un tiempo relativamente corto. Posteriormente se presenta una ligera disminución hasta las 60 horas, lo cual podría deberse a la penetración de los carotenoides al interior de los poros de la resina. En la última fase se observa nuevamente un aumento por un incremento en la adsorción, aunque la variación es muy pequeña.

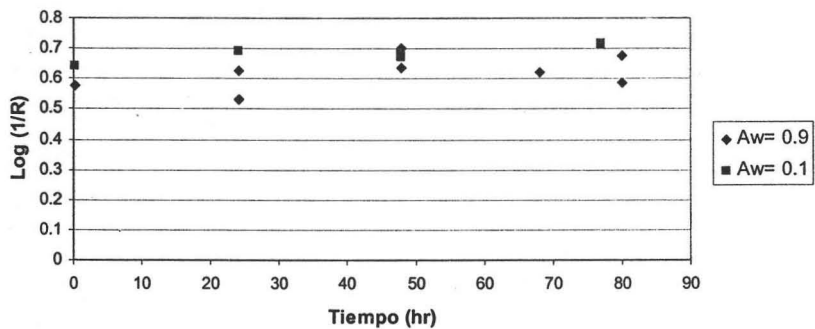


Figura 9: Cinética de adsorción de luteína libre en Lewatit

En la figura 9, vemos que la luteína también se adsorbe rápidamente, y sin presentar posteriormente una variación significativa. Sin embargo la dispersión en las determinaciones no permite determinar una tendencia clara en el proceso de adsorción de sustrato o producto.

B. Medición indirecta por disminución de concentración de carotenoides en solución

Con el objetivo de contar con una base de comparación se probaron dos materiales, tanto la resina Lewatit VP OC como partículas de alúmina por su reconocida capacidad adsorbente. Para ambos materiales se siguió la metodología general, en donde una vez transcurrido cierto tiempo, se separó el sobrenadante, se tomó una alícuota de éste y se midió la disminución en la absorbancia en el espectrofotómetro. El supuesto fundamental es que la disminución de absorbancia debe equivaler a la cantidad adsorbida. Las variaciones en concentración de la fase orgánica en función del tiempo se presentan en las figuras 10 y 11.

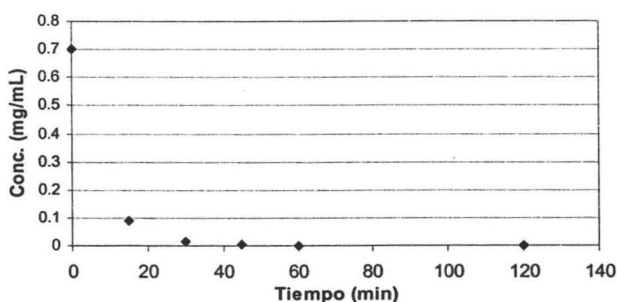


Figura 10: Variación en concentración de diésteres de luteína en hexano por adsorción en alúmina ($A_w = 0.1$)

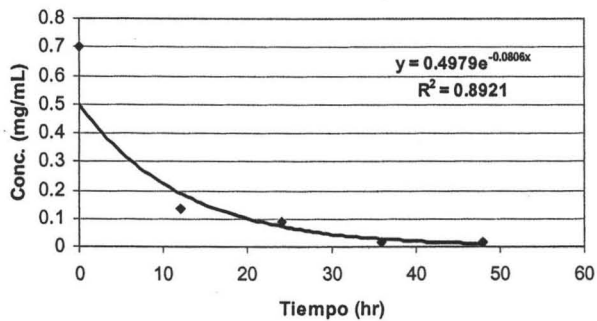


Figura 11: Variación en concentración de diésteres de luteína en hexano por adsorción en alumina ($A_w = 0.9$)

Observando las figuras 10 y 11, podemos determinar que en ambos casos la mayor adsorción de diésteres de luteína se lleva a cabo en un tiempo relativamente corto seguido de una baja reducción en la concentración del sobrenadante.

Cabe mencionar que para estos dos experimentos el muestreo y por lo tanto las cinéticas se realizaron a tiempos diferentes, pues para A_w de 0.1 la adsorción de diésteres de luteína se llevó a cabo casi en su totalidad en cuestión de minutos, mientras que para $A_w = 0.9$ tomó aproximadamente 48 horas.

Para concluir esta parte del experimento, se realizó un análisis de las pruebas hechas para las dos metodologías, y se observó que la medición por espectrofotometría de reflectancia de carotenoides adsorbidos no es la más adecuada, pues al haber una posible penetración del pigmento al interior de los poros de Lewatit, no hay una medición directa y reproducible.

De esta manera, se eligió la metodología de medición indirecta como la más confiable, por lo que se procedió a realizar las cinéticas a valores extremos de A_w , 0.1 y 0.9, tanto para la luteína como para los diésteres de luteína.

5.2.1 Cinética de desaparición de diésteres de luteína

Con base en los tiempos en los que se lleva a cabo la reacción de la hidrólisis de diésteres de luteína, se eligió un intervalo de tiempo de 0 a 200 horas tomando mediciones en intervalos de 12 y 24 hrs.

Los resultados obtenidos en estos tiempos para los valores elegidos de A_w , se muestran en la figura 12 para el caso de Lewatit:

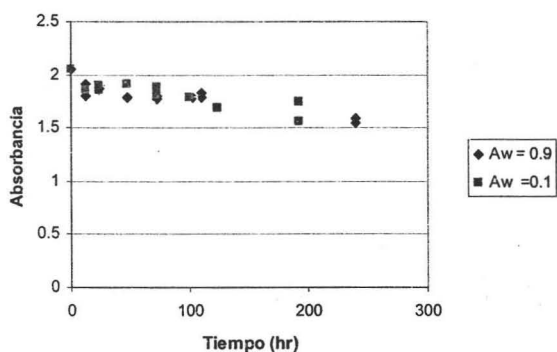


Figura 12: Adsorción de diésteres de luteína por Lewatit monitoreada por absorbancia

Como se observa en la figura 12, la adsorción de diésteres de luteína por Lewatit es considerablemente más lenta que en alúmina a los dos valores probados de A_w , al igual que es poco significativa.

Esto es que si se observa el porcentaje neto de desaparición y por ende de adsorción, el nivel máximo alcanzado a las 280 horas no supera el 30%, con

respecto a la concentración inicial. Controles con una solución de diésteres en ausencia del soporte no mostraron una pérdida del color durante 250 horas.

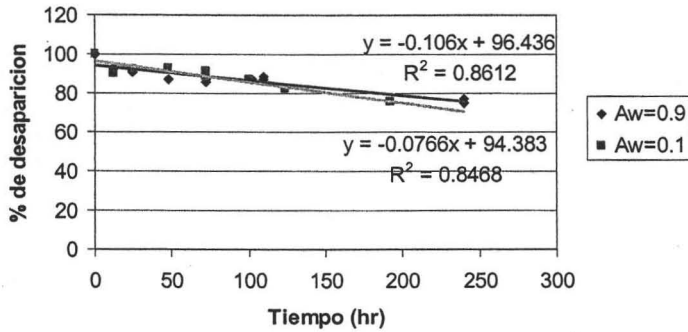


Figura 13: Porcentaje de desaparición de diésteres de luteína

Se puede observar también que para los dos valores de A_w empleados, la variación en disminución de diésteres de luteína por adsorción es prácticamente imperceptible, por lo que se consideraría que en este caso el A_w no ejerce ninguna influencia.

5.2.2 Cinética de desaparición de luteína libre

Como primer paso se realizaron barridos espectrofotométricos para la luteína libre. La metodología usada así como la concentración en mg/mL fue la misma que para los diésteres. El espectro presenta, al igual que para los diésteres el pico principal a 446 nanómetros y un pico secundario a 277 nanómetros, ya que en ambos casos el grupo cromóforo se mantiene. Sin embargo al ser una muestra comercial detectamos algunas impurezas, reflejadas en la aparición de un pico a 274 nm, en el barrido espectrofotométrico (figura 14).

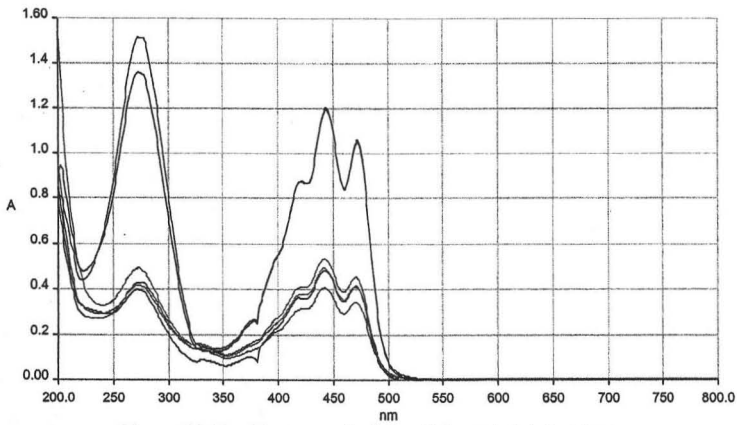


Figura 14: Barridos espectrofotométricos de luteína libre

Teniendo como antecedente que en experimentos realizados por Mora-Pale y Bárzana (2003) se tenía la presunción que el compuesto que mostraba mayor afinidad por la resina era la luteína, se realizaron otra serie de experimentos para determinar la cinética de adsorción de la luteína libre a los mismos valores de A_w con la finalidad de realizar una comparación con los diésteres.

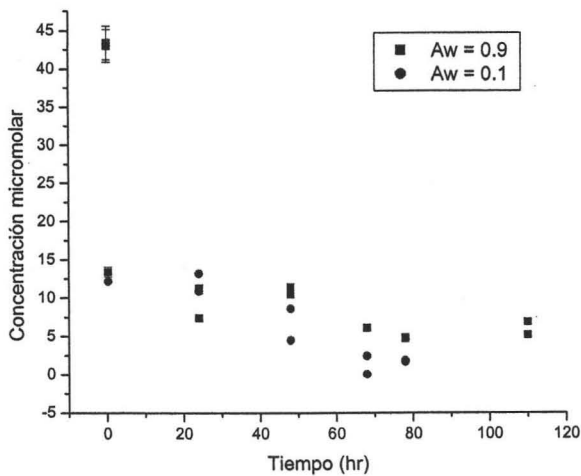


Figura 15: Disminución de la concentración micromolar de luteína por adsorción en Lewatit

Los resultados obtenidos, (figuras 15 y 16) muestran que al igual que para los diésteres de luteína, la mayor cantidad de luteína es adsorbida en un tiempo muy corto y posteriormente solo se observa una ligera variación.

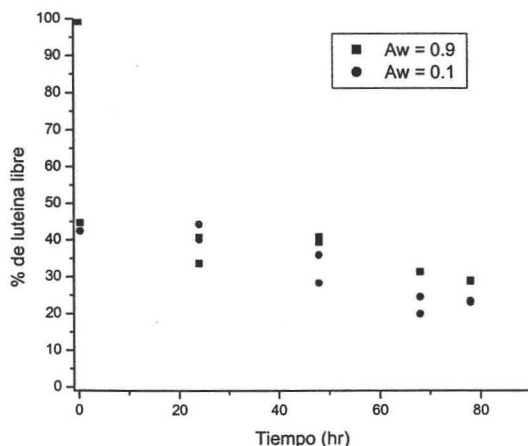


Figura 16: Porcentaje de disminución de luteína libre en hexano por adsorción en Lewatit

Sin embargo, una clara diferencia es que el porcentaje de adsorción para la luteína es de aproximadamente 50% en tan solo unos minutos (figura 16), mientras que para los diésteres no supera el 30% y esto solo después de tiempos largos de contacto mayores a 200 horas. De esta manera se podría determinar que al trabajar prácticamente a las mismas condiciones, la afinidad que muestra la luteína es mucho mayor que la presentada por los diésteres en el caso de la resina Lewatit VP OC 1600.

Por otro lado, para la luteína, al igual que sucedió con los diésteres, podemos observar que la variación de adsorción entre A_w de 0.1 y 0.9 es casi

imperceptible, fenómeno no encontrado en los experimento realizados con alúmina, según se presenta a continuación.

Finalmente, y para fines comparativos, se decidió hacer también una cinética de adsorción de luteína libre pero en alumina a los mismos dos valores de A_w .

Los resultados fueron los siguientes:

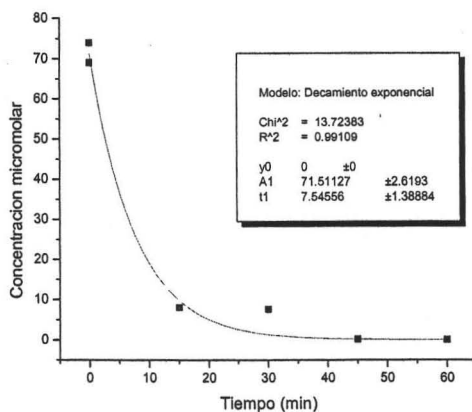


Figura 17: Disminución de luteína por adsorción en alumina $A_w = 0.1$

En las figuras 17 y 18 (adsorción de luteína en alúmina) se observa una cinética similar a las encontradas para este mismo material pero con diéster de luteína. La caída, como lo muestra el modelo, es prácticamente exponencial, contrastando así con la disminución en Lewatit

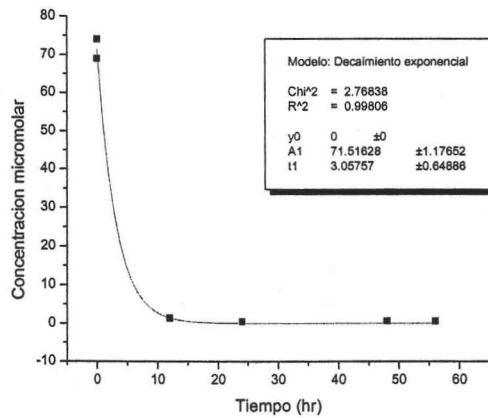


Figura 18: Disminución de luteína por adsorción en alumina Aw = 0.9

En esta última parte observamos que, a Aw de 0.1 la mayor adsorción se da tan solo en 1 hora mientras que a Aw de 0.9, este nivel de adsorción se logra en aproximadamente 60 horas. Es decir obtenemos una cinética similar a la encontrada para los diésteres de luteína, por lo que se puede determinar que para alúmina el Aw sí ejerce un efecto considerable sobre los niveles de adsorción. Podría ocurrir que a Aw de 0.9 se forme una capa de agua alrededor de la alumina impermeable al transporte de la luteína o sus diésteres.

En resumen, durante esta parte del estudio se realizaron cinéticas de adsorción para los dos compuestos participantes en la reacción: la luteína y los diésteres de luteína.

Lo primero que se observa es que el 80% de la adsorción total, tanto para lewattit como para alumina, se da en tiempos muy cortos. Posteriormente, al realizar la comparación entre el total de luteína y diéster de luteína adsorbidos

por Lewatit, se manifiesta una mayor afinidad para el caso de la luteína pues se observa un decremento de aproximadamente 60%, mientras que para el diéster no rebasa el 30%. Esto nos lleva a pensar que en la reacción de hidrólisis la afinidad presentada por la luteína puede provocar una acumulación de esta en el soporte e impedir así la entrada del diéster al sitio de contacto de la enzima. Esto puede dar como resultado un fenómeno equivalente a la inhibición por producto.

Finalmente, se observa que para Lewatit el A_w no influye directamente sobre la adsorción de algunos de los compuestos, caso contrario para la alumina, en donde tanto para diéster como para luteína libre, se detectó una influencia notable del A_w , haciendo que el tiempo de adsorción se redujera de más de 40 horas a poco menos de 80 minutos.

De esta manera, se puede suponer que la influencia del A_w sobre la adsorción de este tipo de compuestos está íntimamente relacionada con la naturaleza del soporte, pues la alumina, en la cual se observó una influencia importante, se caracteriza por ser un compuesto altamente adsorbente.

A pesar de que se fijaron valores definidos de A_w , la cantidad directa de agua ligada a cada uno de los soportes puede ser mucho mayor, generando así un nivel de competencia entre la adsorción de agua y los compuestos participantes en la reacción. Por otro lado, el Lewatit muestra propiedades más bien lipofílicas, de manera que a pesar del ajuste de A_w , la cantidad de agua ligada en relación con la alumina es mucho menor. Esto genera que queden espacios libres suficientes para la adsorción tanto de diésteres como de luteína libre, e incluso para la penetración al interior de los poros de la resina.

En consecuencia, los resultados presentados indican que el efecto del A_w en reacciones de hidrólisis mediadas por lipasas no está correlacionado con los niveles de adsorción de los sustratos o productos en la superficie del soporte de inmovilización. Lo anterior implica que investigaciones futuras deben centrarse en el efecto que el A_w tiene sobre la enzima adsorbida y su actividad para catalizar ésteres de luteína.

7. CONCLUSIONES

Como resultado del presente estudio se puede concluir que:

- La metodología más confiable para el monitoreo de la adsorción de luteína y sus diésteres es la medición indirecta en el sobrenadante. Esto se debe a que presenta una variabilidad mucho más pequeña que la medición por reflectancia.
- La luteína presenta una mayor afinidad por el Lewatit que los diésteres de luteína (60% vs. 30%), provocando así una adsorción mucho mayor (prácticamente del doble). Esto podría asociarse con un modelo equivalente de inhibición por exceso de producto para la reacción enzimática.
- En cuanto a la influencia del A_w , para la alúmina hay un efecto marcado en el que se observa que a altos valores de A_w (0.9) la adsorción disminuye. Este efecto se observa en mayor proporción para los diésteres de luteína que para la luteína libre.
- Para el caso de Lewatit VP OC 1600, el A_w no ejerce una influencia significativa en los niveles de adsorción. Si embargo esta conclusión no se puede extrapolar a la enzima soportada, pues la enzima en si podría presentar un comportamiento puntual y similar al de la alúmina. Esto solo se podría determinar realizando un estudio similar con la enzima libre, que no esta disponible en forma comercial.
- Finalmente, se puede decir que la disminución en la adsorción ante un aumento de la actividad acuosa se puede deber a la competitividad de

adsorción del agua con los compuestos estudiados (luteína y sus diésteres), o a la formación de esferas de hidratación que bloqueen el transporte de sustratos hacia la superficie del soporte. No es el caso para Lewatit por los bajos niveles de hidratación que presenta aún a Aw altos.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios con la enzima libre, producida por fermentación para determinar el efecto directo del Aw sobre la enzima en la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína.
- Inmovilización de enzima libre en alumina y realizar la cinética de hidrólisis de diésteres de luteína para determinar la influencia del soporte y su dependencia conforme al Aw.
- Empleo de un equipo apropiado de medición de reflectancia.
- Evaluar efecto de contenido neto de agua en Lewatit en lugar de Aw.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. REFERENCIAS

1. ADLERKREUTZ, P., 1991, On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media, European Journal of Biochemistry, 199, 609-614.
2. ALVES-RODRIGUES, A. Y SHAO A, 2004, The science behind lutein, Toxicology Letters 150, 57-83.
3. ARROYO, M., SANCHEZ-MONTERO, J. Y SINISTERRA, J., 1999, Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports; Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, Enzyme and Microbial Technology, 24, 3-12.
4. BARZANA, E., 2002, Enzyme mediated solvent extraction of carotenoids from Marigold Flower (*Tagetes erecta*), Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 4491-4496.
5. BREITHAUPT, D., WIRT, U. Y BAMEDI, A., 2002, Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diésteres from marigold flowers (*Tagetes erecta L.*) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry, Journal of Food Chemistry, 50, 66-70.
6. BREITHAUPT, D., ZORN, H. Y TAKENBERG, M., 2003, Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta L.*) and red paprika (*Capsicum annum L.*) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase, Enzyme and Microbial Technology, 32-5.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. HENCKEN, H., 1992, Chemical behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation, Poultry Science, 71, 711-717.
8. HOLDEN, J.M., ELDRIDGE, A.L., BEECHER, G.R., Y SCHAKELI, S., 1999, Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. Journal of Food Composition and Analysis 12:169-196.
9. MARTINEZ-PEÑA, M., CORTES-CUEVAS, A. Y AVILA-GONZALEZ, E., 2004, Evaluación de tres niveles de pigmentos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel en pollos de engorda, Revista Técnica Pecuaria de México, 42, 105-111.
10. MATOUSHEK, R.F., 1974, Xantophylic extraction process, U.S. Patent, 3,789,009.
11. MORA-PALE, M. Y BARZANA-GARCIA E., 2005, Role of water on the lipase mediated hydrolysis of lutein diesters in non-conventional media, Journal of Biotechnology, 12TH European Congress on Biotechnology, Copenhagen.
12. MORA-PALE, M. Y BARZANA-GARCIA E., 2003, Enzyme mediated production of free lutein from marigold flower in nonaqueous media, Biochemical Technology (BIOT) Division, 225th ACS National Meeting, New Orleans.
13. NARANJO-MODAD S. 2000, Extracción de carotenoides y otros compuestos por medio de CO2 en estado supercrítico a partir de *Tagetes Erecta*, Tesis Doctorado en Ciencias Químicas, Facultad de Química.

14. PAEZ, B.C., MEDINA, A.R., Y RUBIO, F.C., 2003, Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalized reactions in organic solvents, Enzyme and Microbial Technology, 33, 845-853.
15. PHILIP, T. Y BERRY, JW., 1975 Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) Flowers, Journal of Food Science, 40: 1089-1090.
16. RODRIGUEZ-AMAYA, D., 2001, A guide to carotenoid analysis in foods, ILSI Press, Washington, 71 p.
17. SALIS A., et al., 2003, The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*, Biochimica et Biophysica Acta, 1646,145-151
18. SHARMA, R., CHISTIB, Y., Y UTAM-CHAND, B., 2001, Production, purification, characterization, and applications of lipases, Biotechnology Advances, 19, 627-662.
19. UPPENBERG, J., et. al., 1994, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, Structure, 2, 293-308.
20. VALIVETY, R., HALLING P.J., 1994, Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. Effects of supports, loading and enzyme preparation, European Journal of Biochemistry, 222, 461-466.
21. VERMUE, M.H., 1995, Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects, Pure and Applied Chemistry, 67, 345-373.
22. WEHTJE, E., Y ADLERKREUTZ, P., 1997, Lipases have similar water activity profiles in different reactions, Biotechnology Letters, 19, 6, 537-540.