



---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN INGENIERÍA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROCESOS DE ENZIMÁTICOS COMO ALTERNATIVA  
A LA EXTRACCIÓN INDUSTRIAL DE LUTEÍNA DE  
FLOR DE CEMPASÚCHIL (*Tagetes erecta*): UN  
ANÁLISIS COMPARATIVO BASADO EN  
TECNICAS DE SIMULACIÓN DE PROCESOS**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERÍA  
QUÍMICA - BIOCATALISIS**

PRESENTA:

**IBQ. Lázaro Gabriel Trujillo Juárez**

TUTOR:

**DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: DR. CARLOS ESCOBAR TOLEDO  
SECRETARIO: DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO  
VOCAL: DR. JAIME VERNON CARTER  
1er SUPLENTE: DR. SERGIO HUERTA OCHOA  
2do SUPLENTE: DR. ALFONSO DURÁN MORENO

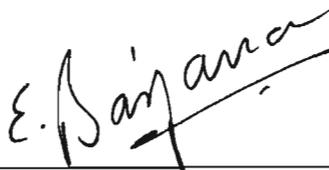
**LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

LABORATORIO 314  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
CONJUNTO "E"  
FACULTAD DE QUÍMICA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Lázaro Gabriel Trujillo Juárez  
FECHA: 14 / Noviembre / 2005  
FIRMA: 

**TUTOR DE TESIS:**

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



\_\_\_\_\_  
FIRMA

## DEDICATORIA

*A Dios por permitirme llegar hasta aquí, acompañarme en todo momento y ser más que una imagen en una iglesia, ser realmente mi amigo, en las buenas y en las malas. Gracias por no apartarte de mí.*

*A ti papá, porque aunque ya no estás conmigo, sé que desde algún lugar te has sentido orgulloso de mí, como siempre lo estuviste, gracias por lo poco pero con gran intensidad que me diste.*

*A ti mamá, por ser más que una madre para mí, ser mi amiga, mi confidente, mi todo, eres el regalo más grande que Dios me pudo dar y sólo por eso, le estaré eternamente agradecido.*

*A mis tíos Mario, Manuel y José, por estar presentes siempre, pareciera que no, pero siempre están ahí cuando los he necesitado, gracias por todo su apoyo, en especial en esta última etapa que no fue fácil.*

*A ustedes dedico esta tesis de maestría pues sé que sin su apoyo y ayuda no lo hubiese logrado.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A mi familia: por su presencia*

*A mis abuelitos: Gumersindo y Jorge, en donde quiera que estén. Gracias por todo su amor.*

*A mis tías: Estela, Guadalupe, Ramona y Gripina*

*A mi tío Ambrosio*

*A mis primos, porque cada uno desde su "trinchera" me ha demostrado su afecto y apoyo.*

*A mis amigos de siempre: Anilú, Rolando, Bianca, Erick y Nora, gracias por su apoyo y amistad, son pequeñas flores que adornan mi camino.*

*A mis nuevos amigos: Rodolfo, Brenda, Polita, Jessica, Lilia y Daniel, por su afecto, amistad, gracias por hacer este recorrido un poco más divertido y ser personas que realmente me demostraron su amistad.*

*A mi asesor de Tesis:*

*Dr. Eduardo Bárzana García, gracias Doc por todo tu apoyo, por tu empuje, tu ánimo, por ser más que solo un tutor de tesis, ser realmente nuestro amigo, gracias por hacer posible este proyecto.*

*A mi jurado de examen de grado:*

*Dr. Carlos Escobar Toledo, Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Jaime Vernon Carter, Dr. Sergio Huerta Ochoa, Dr. Alfonso Durán Moreno, por las contribuciones que hicieron a este trabajo. Gracias por su apoyo y disponibilidad.*

*A mis compañeros del Laboratorio 314:*

*A Don Pedro, Oscar, Alberto, Erick, Julio, Mauricio y Carmina.*

*Al CONACyT por la beca otorgada durante el periodo de febrero 2001 a enero del 2003 ya que gracias a su apoyo el proyecto se llevo a cabo.*

*A la DGEP por la beca otorgada de febrero del 2002 a enero del 2003 porque gracias a su apoyo se llevo a cabo la realización de este proyecto.*

*A la DGAPA por la beca otorgada de agosto a noviembre del 2003, porque sin su apoyo no se hubiese llevado a cabo la culminación de este proyecto.*

*Y por si la memoria me hubiese fallado, agradezco a todos aquellos que de alguna u otra manera hicieron posible que este trabajo de tesis se llevara a cabo...*

*GRACIAS*

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

<b>Simbología</b>	<b>Significado</b>
SPD	SuperPro Designer
ABP	Aspen Bioprocess Plus
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
FDA	Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de América
CFR	Código de regulaciones federales
DMRE	Degeneración macular relacionada con la edad
NEI	Instituto Nacional de la vista de los Estados Unidos de América
CIP	Limpieza <i>in situ</i>
SIP	Esterilización <i>in situ</i>
MIT	Instituto Tecnológico de Massachusetts
ASPEN	Sistema avanzado para la ingeniería de procesos
BPEC	Centro de Ingeniería y Biotecnología de procesos
FD&C	Colorante permitido para su uso en alimentos y drogas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Bancomext	Banco de comercio exterior S. C.
SSA	Secretaría de salud
Enamex	Extractos naturales mexicanos S. A. de C. V.
SEMARNAT	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
PBR	Reactor de lecho empacado
BR	Reactor por lote ó intermitente
CSTR	Reactor de tanque agitado en flujo continuo
PFR	Reactor tipo flujo pistón
P	Proceso
S	Segundos
W	Peso
Kg	Kilogramo
$\Sigma$	Sumatoria
h	Hora
L	Litro
G	Gramo
$V_i$	Velocidad inicial
M	Metros
$K_{cat}$	Constante catalítica
CDTP	Costo directo total de la planta
CCE	Costo de compra del equipo
CITP	Costo indirecto total del planta
CTP	Costo total de la planta
CFD	Capital fijo directo
\$	Dólares
$\mu\text{M}$	micromolar ( $\mu\text{mol/L}$ )
$\mu\text{mol}$	micromol

## ÍNDICE GENERAL

	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	xii
<b>RESUMEN</b>	01
 <b>CAPÍTULO</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>02</b>
1.1 Importancia de la luteína.	02
1.2. Uso en humanos.	03
1.3 Uso avícola.	04
1.4 Etapa de saponificación	05
1.5 Lipasas como agentes enzimáticos de desesterificación.	06
1.6 Justificación.	08
1.7 Objetivos.	10
1.7.1 Objetivo general.	10
1.7.2 Objetivos particulares.	10
<b>2. ANTECEDENTES.</b>	<b>11</b>
2.1 Colorantes y pigmentos.	11
2.1.1 Carotenoides.	11
2.1.1.1 Propiedades, funciones y acciones de los carotenoides.	16
2.1.1.2 Luteína.	20
2.1.1.2.1 Biodisponibilidad de la luteína y de los ésteres de luteína.	22
2.1.1.2.2 La luteína en la piel.	23
2.1.1.2.3 La luteína en la mácula visual.	24
2.2.1 2.4 Aplicaciones de la luteína.	26
2.1.2 La flor de cempasúchil ( <i>Tagetes erecta</i> L.).	27
2.2. Modelos de simulación de procesos.	30
2.2.1 Surgimiento y desarrollo.	31
2.2.2 Simuladores comerciales.	32
2.2.3 Simulación de procesos biotecnológicos utilizando el SPD.	33
<b>3. METODOLOGÍA DEL TRABAJO.</b>	<b>37</b>
3.1 Aspectos comerciales.	37
3.2 Producción nacional.	39
3.3 Cálculo de la base de producción.	40

3.4	Operación general del simulador SuperPro Designer (SPD).	42
3.4.1	Obtención de los datos de entrada al simulador.	44
3.4.1.1	Determinación de la composición proximal de la flor <i>T. erecta</i> .	44
3.4.1.2	Composición de la flor fresca y de la harina considerando a la luteína y demás carotenoides.	45
3.4.2	Datos alimentados al proceso en el simulador.	46
3.4.3	Procesos propuestos.	50
3.4.3.1	Proceso tradicional empleado industrialmente.	50
3.4.3.2	Pre-tratamiento de flor con enzimas hidrolíticas seguido de una extracción con solventes.	53
3.4.3.3	Extracción de harina sustituyendo la desesterificación con sosa por lipasas.	55
3.4.3.4	Extracción de flor auxiliada con dos pasos enzimáticos.	59
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>60</b>
4.1	Balance de materiales y condiciones de operación de cada uno de los procesos obtenidos por el SPD.	60
4.1.1	P 1. Proceso tradicional empleado industrialmente.	60
4.1.1.1	Materiales.	66
4.1.1.2	Condiciones de operación.	61
4.1.1.2.1	Extractor.	61
4.1.1.2.2	Evaporador.	63
4.1.1.2.3	Reactor químico.	63
4.1.1.3	Simulaciones para el proceso P 1.	64
4.1.1.3.1	Tiempo de proceso.	64
4.1.1.3.2	Diseño de los equipos.	65
4.1.1.3.3	Salida del proceso.	67
4.1.2	P 2. Pre-tratamiento de flor con enzimas hidrolíticas seguido de una extracción con solventes.	68
4.1.2.1	Materiales.	68
4.1.2.2	Condiciones de operación.	69
4.1.2.2.1	Reactor enzimático 1.	70
4.1.2.3	Simulaciones para el proceso P2.	72
4.1.2.3.1	Reactor enzimático 1.	72
4.1.2.3.2	Tiempo de proceso.	74
4.1.2.3.3	Diseño de los equipos.	77
4.1.2.3.4	Salida del proceso.	78
4.1.3	P 3. Extracción de harina sustituyendo la desesterificación con sosa por lipasas.	79
4.1.3.1	Materiales.	79
4.1.3.2	Condiciones de operación.	80
4.1.3.2.1	Reactor enzimático 2.	80
4.1.3.3	Simulaciones para el proceso P 3.	82

4.1.3.3.1	Reactor enzimático 2.	82
4.1.3.3.2	Tiempo de proceso.	84
4.1.3.3.3	Diseño de los equipos.	85
4.1.3.3.4	Salida del proceso.	87
4.1.4	P 4. Extracción de flor auxiliada con dos pasos enzimáticos.	88
4.1.4.1	Materiales.	88
4.1.4.2	Condiciones de operación.	89
4.1.4.3	Simulaciones para el proceso 4.	90
4.1.4.3.1	Tiempo de proceso.	90
4.1.4.3.2	Diseño de los equipos.	92
4.1.4.3.3	Salida del proceso.	93
4.2	Análisis económico.	94
4.2.1	Proceso P 1.	94
4.2.1.1	Análisis de sensibilidad.	99
4.2.2	Proceso P 2.	100
4.2.2.1	Análisis de sensibilidad.	105
4.2.3	Proceso P 3.	106
4.2.3.1	Análisis de sensibilidad.	112
4.2.4	Proceso P 4.	113
4.2.4.1	Análisis de sensibilidad.	118
4.3	Comparación de los procesos.	119
4.3.1	Determinación del paso limitante.	122
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.</b>	<b>123</b>
5.1	Conclusiones.	123
5.2	Recomendaciones.	126
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>128</b>

## ANEXOS

<b>A1</b>	<b>Descripción del proceso tradicional para la obtención de la harina de flor de cempasúchil</b>	<b>134</b>
A1.1	Operaciones de proceso.	135
A1.1.1	Ensilado.	135
A1.1.2	Prensado.	135
A1.1.3	Molienda.	136
A1.1.4	Secado.	136
A1.1.5	Empacado.	136
A1.2	Diagrama de flujo del proceso.	137
<b>A2</b>	<b>Cálculo de la <math>K_{cat}</math> para la hidrólisis de los diésteres de luteína</b>	<b>138</b>
<b>A3</b>	<b>Estandarización de un método para determinar actividad enzimática de lipasas basado en cromatografía de gases</b>	<b>142</b>
A3.1	Introducción	142
A3.2	Materiales.	142
A3.3	Metodología.	143
A3.3.1	Método experimental.	143
A3.3.2	Método analítico.	143
A3.4	Resultados.	144
A3.4.1	Actividad enzimática.	146
A3.4.2	Eficiencia catalítica.	148
A3.4.2.1	Gráfica de Lineweaver-Burk.	149
A3.4.2.2	Gráfica de Eadie o Hanes.	150
A3.4.2.3	Gráfica de Hofstee.	151
<b>A4</b>	<b>Proceso de purificación de luteína</b>	<b>153</b>
A4.1	Descripción del proceso.	153
A4.2	Materiales.	154
A4.3	Condiciones de operación.	156
A4.3.1	Columna de adsorción.	156
A4.3.2	Secador de aspersion.	157
A4.3.3	Mezclador y acondicionador.	157
A4.3.4	Embasado de embalaje.	157

A4.4	Simulaciones para el proceso de purificación.	158
A4.4.1	Tiempo de proceso.	158
A4.4.2	Diseño de los equipos.	160
A4.4.3	Salida del proceso.	161
A4.5	Análisis económico	162

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Cantidad de carotenoides (mg/100g) en frutos seleccionados (Schalch, 2000).	16
Tabla 2. Comportamiento histórico de las importaciones de harina de flor de cempasúchil y la variación del precio por kilogramo por año, hasta octubre del 2003 (Bancomext, 2004).	38
Tabla 3. Estudio bromatológico de la flor fresca, la flor seca y la harina seca (Naranjo, 2000).	44
Tabla 4. Valores de la de la extracción de oleorresina a partir de la harina seca (Naranjo, 2000).	44
Tabla 5. Xantofilas totales en la oleorresina, el precipitado y el sobrenadante una vez concluida la extracción (Naranjo, 2000).	45
Tabla 6. Composición porcentual de xantofilas en la harina de flor de cempasúchil (Bioquimex, 2002).	45
Tabla 7. Cantidades de cada uno de los componentes de la flor tomando en cuenta los carotenoides presentes en la flor de cempasúchil.	46
Tabla 8. Perfil típico de ácidos grasos que esterifican a las xantofilas que están en la flor de cempasúchil (Bioquimex, 2002).	52
Tabla 9. Caracterización de las aguas residuales del ensilado y del prensado de la flor de cempasúchil y los valores máximos permisibles por la norma oficial mexicana (SEMARNAT, 2004).	53
Tabla 10. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 1.	61
Tabla 11. Coeficientes de partición de los compuestos solubles en hexano (Cooper <i>et al.</i> , 1997).	62
Tabla 12. Solubilidad de los solventes que forman el sistema bifásico agua-hexano (Reddy <i>et al.</i> , 2003).	62
Tabla 13. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 1.	64
Tabla 14. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 1.	66
Tabla 15. Composición de luteína y xantófilas (xantófilas totales) en la salida para el proceso 1 y comparación con lo reportado por Bioquimex.	67
Tabla 16. Kilogramos de materia prima alimentados para el proceso 2.	69
Tabla 17. Condiciones de reacción para la hidrólisis de la celulosa.	71
Tabla 18. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 2.	75
Tabla 19. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 2.	77
Tabla 20. Composición de luteína y xantófilas (xantófilas totales) en la salida para el proceso 2 y comparación con lo reportado por Bioquimex.	78
Tabla 21. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 3.	80
Tabla 22. Condiciones de reacción para la hidrólisis del dipalmitato de luteína.	81
Tabla 23. Tiempo de operación de cada equipo del proceso en 3.	84
Tabla 24. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 3.	86

Tabla 25.	Composición de luteína y xantófilas (xantófilas totales) en la salida para el proceso 3 y comparación con lo reportado por Bioquimex.	87
Tabla 26.	Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 4.	89
Tabla 27.	Tiempo de operación de cada equipo del proceso 4.	90
Tabla 28.	Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 4.	92
Tabla 29.	Composición de luteína y xantófilas (xantófilas totales) en la salida para el proceso 4 y comparación con lo reportado por Bioquimex.	93
Tabla 30.	Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 1.	94
Tabla 31.	Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 1.	95
Tabla 32.	Resumen del capital fijo estimado para el proceso 1.	95
Tabla 33.	Resumen de costos de operación anual para el proceso 1.	97
Tabla 34.	Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 1.	97
Tabla 35.	Análisis de factibilidad para el proceso 1.	98
Tabla 36.	Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 2.	100
Tabla 37.	Precios de los equipos que se utilizan en el proceso 2.	101
Tabla 38.	Resumen del capital fijo estimado para el proceso 2.	102
Tabla 39.	Resumen de costos de operación anual para el proceso 2.	103
Tabla 40.	Desglose de los pasos para el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 2.	103
Tabla 41.	Análisis de factibilidad para el proceso 2.	104
Tabla 42.	Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 3.	106
Tabla 43.	Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 3.	107
Tabla 44.	Resumen del capital fijo estimado para el proceso 3.	108
Tabla 45.	Resumen de costos de operación anual para el proceso 3.	109
Tabla 46.	Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 3.	110
Tabla 47.	Análisis de factibilidad para el proceso 3.	111
Tabla 48.	Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 4.	113
Tabla 49.	Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 4.	114
Tabla 50.	Resumen del capital fijo estimado para el proceso 4.	115
Tabla 51.	Resumen de costos de operación anual para el proceso 4.	116
Tabla 52.	Análisis de factibilidad para el proceso 4.	117
Tabla 53.	Comparación de los tres procesos en estudio con el método tradicional.	120

## ÍNDICE DE TABLAS (ANEXO)

Tabla A1.	Rendimiento promedio de flor por hectárea (Casarrubias y Hernández, 1996).	135
Tabla A2.	Cuantificación de las especies de la reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> y la lipasa de <i>Mucor miehei</i> .	138
Tabla A3.	Comparativo de la actividad obtenida con la reportada en la literatura especializada.	147
Tabla A4.	Comparativo de las constantes cinéticas por tres diferentes métodos de arreglo de la ecuación de Michaelis-Menten.	152
Tabla A5.	Kilogramos de materia prima alimentados al proceso de purificación.	155
Tabla A6.	Tiempo de operación de cada equipo del proceso de purificación.	159
Tabla A7.	Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso de purificación.	161
Tabla A8.	Composición de luteína y xantófilas (xantófilas totales) en la salida para el proceso de purificación y comparación con lo reportado por Bioquimex.	162
Tabla A9.	Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso de purificación.	163
Tabla A10.	Precio de los equipos que se utilizan en el proceso de purificación.	164
Tabla A11.	Resumen del capital fijo estimado para el proceso de purificación.	164
Tabla A12.	Resumen de costos de operación anual para el proceso de purificación.	166
Tabla A13.	Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso de purificación.	166
Tabla A14.	Análisis de factibilidad para el proceso de purificación.	167

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1.	Estructuras químicas de algunos carotenos y carotenoides. 15
Figura 2.	Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999). 17
Figura 3.	Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999). 19
Figura 4.	<i>Trans</i> luteína. 21
Figura 5.	Isomerización de la luteína. 22
Figura 6.	Flor de cempasúchil ( <i>Tagetes erecta</i> L.). 28
Figura 7.	Sistema de Arquitectura del SPD. 36
Figura 8.	Valor de los movimientos comerciales (importaciones y exportaciones) de la harina de flor de cempasúchil de 1990 a Octubre del 2003, incluida la tasa de inflación bajo la fracción arancelaria 1404.10.01 (BANCOMEXT, 2004). 37
Figura 9.	Comportamiento histórico de la producción nacional de cempasúchil en el año agrícola de 1993-2002, dividido en primavera-verano y otoño-invierno y total (SAGARPA, 2004). 39
Figura 10.	Comportamiento histórico y proyección hasta el año 2015 para las importaciones de harina de flor de cempasúchil. 41
Figura 11.	Ventana para escoger el modo de operación y el tiempo de operación anual de la planta. 43
Figura 12.	Menú principal del SPD donde aparece la base de datos y las diferentes opciones para introducir materiales nuevos que no están considerados en el programa. 47
Figura 13.	Lista de compuestos agregados a la base de datos del SPD, para ser usados en cada simulación. 48
Figura 14.	Lista de las mezclas agregadas a la base de datos del SPD, para ser usados en cada simulación. 48
Figura 15.	Menú de operaciones unitarias que incluye el SPD. 49
Figura 16.	Esquema de extracción de los colorantes de la flor de cempasúchil (Bioquimex, 2002). 51
Figura 17.	Reacción de hidrólisis de la celulosa. 54
Figura 18.	Ruta que sigue la luteína en el cuerpo humano, desde la ingesta, hasta su ubicación final en el ojo (Landrum <i>et al.</i> , 1997). 57
Figura 19.	Reacción de desesterificación del dipalmitato de luteína. 58
Figura 20.	Diagrama del proceso 1 utilizado el SPD. 60
Figura 21.	Balance de materiales general para el proceso 1 (kg/10 horas). 60
Figura 22.	Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso 1, indicando los tiempos empleados en cada una de las operaciones unitarias. 65
Figura 23.	Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 1. 66
Figura 24.	Diagrama del proceso 2 utilizando el SPD. 68

Figura 25.	Balance de materiales general para el proceso 2 (kg/11.83 horas).	68
Figura 26.	Cinética de reacción de la hidrólisis enzimática de celulosa.	72
Figura 27.	Gráfico que muestra la aparición de glucosa con respecto al tiempo a diferentes concentraciones iniciales de enzima.	73
Figura 28.	Gráfico que muestra la relación hiperbólica de la velocidad inicial con respecto a la concentración de enzima.	74
Figura 29.	Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso 2, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.	76
Figura 30.	Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 2.	76
Figura 31.	Diagrama del proceso 3 utilizando el SPD.	79
Figura 32.	Balance de materiales general para el proceso 3 (kg/30.7 horas).	79
Figura 33.	Cinética de hidrólisis del dipalmitato de luteína, obtenido por el SPD	82
Figura 34.	Gráfico de la cinética de la hidrólisis del dipalmitato de luteína con respecto al tiempo a diferentes concentraciones iniciales de lipasa.	83
Figura 35.	Gráfica que muestra la relación que guarda la velocidad inicial de la reacción con respecto a la concentración inicial.	84
Figura 36.	Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso 3, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.	85
Figura 37.	Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 3.	86
Figura 38.	Diagrama del proceso 4 utilizando el SPD.	88
Figura 39.	Balance de materiales general para el proceso 4 (kg/30.7 horas).	88
Figura 40.	Gráfica de Gantt para un solo lote del proceso 4, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.	91
Figura 41.	Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 4.	91
Figura 42.	Costo de producción como una función del número de lotes y de la capacidad de la planta.	99
Figura 43.	Costo de producción como función del precio por kilogramo de hexano.	105
Figura 44.	Costo de producción en función del biocatalizador empleado en la hidrólisis de los diésteres de luteína y en el número de horas de residencia en el reactor enzimático.	112

## ÍNDICE DE FIGURAS (ANEXO)

Figura A1.	Diagrama de bloques y balances de masa para una planta deshidratadora de cempasúchil en México (Casarrubias y Hernández, 1996).	137
Figura A2.	Ajuste polinómico de tercer orden usando del programa Origin®.	139
Figura A3.	Ventana que muestra los valores de las constantes de la ecuación de tercer orden obtenida del programa Origin®.	140
Figura A4.	Gráfica que muestra la regresión lineal o de doble recíprocas, que se realizó para obtener las constantes: $K_M$ y $V_{max}$ .	140
Figura A5.	Reacción de transesterificación del acetato de vinilo y del 1-butanol.	142
Figura A6.	Curva patrón de acetato de vinilo.	144
Figura A7.	Cromatograma general que muestra los picos de tres de los cuatro compuestos que participan en la reacción así como el solvente (hexano).	145
Figura A8.	Cinética de desaparición del acetato de vinilo con respecto al tiempo.	146
Figura A9.	Curva de saturación del acetato de vinilo.	148
Figura A10.	Gráfica de Lineweaver-Burk.	149
Figura A11.	Gráfica de Eadie o Hanes.	150
Figura A12.	Gráfica de Hofstee.	151
Figura A13.	Diagrama del proceso de purificación utilizando el SPD.	153
Figura A14.	Balance de materiales general para el proceso de purificación (kg/31.87 horas).	155
Figura A15.	Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso de purificación, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.	159
Figura A16.	Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso de purificación.	160

## RESUMEN

El proceso tradicional para la extracción de colorantes vegetales liposolubles orientado para la industria avícola, en particular la luteína, está implementado industrialmente desde décadas. Sin embargo este proceso conlleva muchas limitaciones si se quiere que el producto final sea apropiado para consumo humano. El proceso tradicional para la obtención de la harina de la flor involucra un ensilado donde se producen efluentes contaminantes, los cuales son vertidos a los efluentes naturales o al sistema de alcantarillado municipal sin ningún tratamiento. Otro punto crítico en el proceso es el empleo de sustancias utilizadas en la hidrólisis de luteína (bases o álcalis), que han sido prohibidas por los organismos gubernamentales especializados para productos grado alimenticio. Por todo esto, se han desarrollado procesos alternativos. Dos de los procesos en etapa de desarrollo son la maceración mediada por enzimas hidrolíticas para sustituir el ensilado microbiano y la hidrólisis de los ésteres de luteína utilizando lipasas para reemplazar el uso de las bases. En este trabajo se llevó a cabo el desarrollo de los procesos que involucran pasos enzimáticos, a nivel industrial, utilizando el programa comercial SuperPro Designer (Intelligen Inc.) donde se evaluaron los procesos en estudio por separado y un tercer proceso donde se incluyen ambos pasos enzimáticos. La metodología utilizada involucró una revisión de los procesos, características fisicoquímicas y económicas de las materias primas, las condiciones de operación de cada uno de los quipos, el manejo y la familiarización del simulador y la obtención de los parámetros de operación. Los resultados indican que para el proceso tradicional se contemplan 1000 lotes/año con tiempo de 10h/lote, con un costo de producción de \$1,075.00 dólares/kg de luteína, una tasa de retorno de 34.17% y un tiempo de recuperación de la inversión de 2.9 años, con un precio del producto final de \$1,279 dólares/kg de luteína. Para el proceso una maceración enzimática se contemplan 1438 lotes/año con un tiempo de 11.83 h/lote, con un costo de producción de \$3,471.00 dólares/kg de luteína, una tasa de retorno de 45.10% y un tiempo de recuperación de la inversión de 2.2 años, con un precio del producto final de \$4,166.00 dólares/kg de luteína. En el tercer proceso donde se utilizan lipasas se establecieron 257 lotes/año con un tiempo de 41.75 horas/lote, con un costo de producción de \$32,031.00 dólares/kg de luteína, una tasa de retorno de 34.96% y un tiempo de recuperación de la inversión de 2.9 años, con un precio del producto final de \$34,995.00 dólares/kg de luteína. El cuarto proceso, donde se presentan los dos pasos enzimáticos integrados en el mismo proceso se predijeron 257 lotes/año con un tiempo de 30.67 h/lote, con un costo de producción de \$71,171.00 dólares/kg de luteína, una tasa de retorno de 13.32% y un tiempo de recuperación de 7.5 años, con un precio del producto final de \$74,000.00 dólares/kg de luteína. El proceso tradicional es más factible económicamente, sin embargo el proceso mas favorable es el que incluye ambos pasos enzimáticos, debido a que este no produce aguas residuales y evita el uso de álcalis. Es necesario buscar solventes o cosolventes para reducir los tiempos de proceso y el uso de reactores empacados para que los biocatalizadores se puedan rehusar en varios lotes; esos dos factores determinan la productividad de los procesos para ser empleados a nivel industrial. El aporte de este trabajo consistió en comparar un proceso industrial, con otros en entapa de desarrollo involucrando el empleo de enzimas, mediante un simulador comercial con el fin de orientar los trabajos futuros a nivel experimental. Así mismo, el conocer los pasos limitantes de etapas de proceso permitirá enfocar la atención de procesos más desarrollados.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Importancia de la luteína.

La elaboración industrial de alimentos requiere de aditivos para ofrecer productos con colores más atractivos a la vista de los consumidores. Estos aditivos incluyen colores obtenidos de fuentes naturales, como vegetales, animales o minerales. Entre los colorantes naturales más importantes usados en la industria alimentaria están antocianinas, betalainas, carotenoides y clorofilas.

Los carotenoides son los responsables de los pigmentos amarillo, naranja y rojo presentes en una gran variedad de plantas y animales, incluyendo zanahorias, tomates rojos, mantequilla, queso, pimiento morrón, aceite de palma, granos de maíz, pétalos de cempasúchil, achiote y salmón rojo. Los carotenoides incluyen los carotenos y sus derivados oxigenados, las xantofilas (González *et al.*, 1997). Algunas de estas xantofilas no sólo ayudan a la coloración de los alimentos, si no que traen beneficios a la salud, sirviendo predominantemente como antioxidantes e impidiendo la formación de radicales libres en el organismo. En la actualidad existen un número importante de complementos alimenticios, los cuales tienen dentro de su formulación diversos pigmentos de origen vegetal (Schwartz, 2002).

Uno de estos compuestos es la luteína, carotenoide que se encuentra en algunos vegetales verdes y en algunas flores, como la flor de cempasúchil. La luteína fue encontrada como parte de la mácula del ojo en 1963, cuando George Wald, ganador del Premio Nóbel, estudió la fisiología de la visión. Pero no fue si no hasta 1985 cuando se determinó que la luteína era parte de la mácula. En este mismo año, también la zeaxantina fue descubierta en este tejido del ojo.

En los siguientes años se llevó a cabo una caracterización completa de los carotenoides presentes en la mácula, dando como resultado la relación de estos compuestos con la degeneración macular relacionada con la edad. A partir de

estos estudios se llegó a la aseveración de que el consumo de luteína y zeaxantina están asociadas con la reducción de la degeneración macular.

Otros estudios asociaron la ingestión de la luteína en la dieta con la reducción del riesgo de desarrollar cáncer de piel y de pulmón, así como en la reducción de la peroxidación lipídica que conlleva a enfermedades cardíacas y con efectos protectores contra la aparición de cataratas (Landrum y Bone, 2001).

## 1.2 Uso en humanos.

El interés médico hacia la luteína se ha incrementado en los últimos quince años, debido a que este pigmento además de ser provitamínico, ha demostrado tener capacidad de protección contra el daño fotooxidativo en tejidos de humanos. Las funciones antioxidantes de la luteína se han asociado a la disminución del daño al ADN y a la transformación maligna celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual parece producir un decremento en la incidencia de algunos tipos de cáncer y de enfermedades degenerativas como las cataratas y la degeneración macular (Rodríguez-Amaya, 1999). La degeneración macular relacionada con la edad está relacionada inversamente con la acumulación de luteína y zeaxantina en la mácula, y la ingesta de grandes cantidades de luteína sola está relacionada con la reducción de este padecimiento según estudios epidemiológicos (Bowen *et al.*, 2002).

Los carotenoides se encuentran comúnmente en naranjas, así como en frutas y vegetales verdes ó amarillos. Estos reciben una considerable importancia, debido a las diversas funciones que tienen sobre la salud del ser humano, tales como anticancerígenos y precursores de la pro-vitamina A. Esto ha tenido como resultado un incremento considerable en el uso de estos colorantes naturales en alimentos formulados. Algunos de estos carotenoides tienen una utilidad "ilimitada" debido al gran potencial que presentan como aditivos en alimentos (Subagio y Morita, 2001).

### 1.3 Uso avícola.

La carotenogénesis se lleva a cabo únicamente en el reino vegetal; los animales no pueden sintetizarlos, por lo que dependen de las fuentes dietéticas para cubrir sus diversas necesidades.

En las aves, los procesos metabólicos ligados al sexo, determinan que el pollo de engorda deposite el pigmento en el tejido adiposo de la piel y en el tejido queratinoso del pico y las patas, mientras que la gallina de postura lo deposita en la yema del huevo. El color de la piel del pollo y de la yema del huevo, tiene gran importancia en la comercialización de estos productos, sobre todo en países en que tradicionalmente se usa el maíz para la alimentación de las aves.

Cuando la producción avícola dejó de ser una actividad casera en donde los pollos y las gallinas se criaban en semilibertad en corrales y traspatios y pasa a ser una actividad pecuaria industrializada, las aves consumen alimentos balanceados, que si bien cubren todos los requerimientos nutricionales, al sustituir alimentos que contengan carotenoides (maíz, gluten, alfalfa, etc.) estas ya no disponen de fuentes de pigmento en forma natural. Lo anterior hace necesario agregar al alimento balanceado, pigmentos adicionales ya sean sintéticos o naturales, para mantener el color en la piel del pollo y la yema del huevo.

La diferenciación del producto, así como la relación del color con la salud, constituye una ventaja comercial que se traduce en mejor precio de venta y preferencia por los pollos asaderos de alta pigmentación y los huevos de yemas de color naranja intenso. Estudios de mercado en diferentes países muestran que existe correlación entre el tono e intensidad de la pigmentación del pollo y el huevo, y la percepción de calidad de estos productos y consecuentemente el precio de venta de los mismos (ALCOSA, 2004).

La pigmentación natural de las aves de corral (en particular, pollos) es afectada por el contenido de carotenoides en la dieta. En particular, el extracto de flores de

cepasúchil es usado comercialmente en alimentos para aves de corral para mejorar la coloración de grasa, piel y yema del huevo.

Los carotenoides, en particular los dihidroxi-carotenoides (también conocidos como xantofilas) luteína y zeaxantina, son los compuestos de interés en el extracto de flor de cempasúchil orientados para la alimentación de aves de corral. Para la distribución e incremento de luteína por los diferentes tejidos, la luteína libre o esterificada es absorbida en el torrente sanguíneo. La hidrólisis parcial (40-60%) del pigmento esterificado también se lleva a cabo dentro del intestino del pollo.

Generalmente, se lleva a cabo una saponificación durante la manufactura de las preparaciones comerciales para incrementar el rendimiento de la pigmentación del extracto. Una vez ingerida, la luteína libre es transportada y almacenada en el hígado o en sitios cercanos a la piel como luteína diesterificada. Un color amarillo brillante en huevos, piel y tejidos grasos está asociado con una buena salud y una calidad de primera por los consumidores (Hadden *et al.*, 1999).

#### **1.4 Etapa de saponificación.**

Los ésteres de carotenoides y los carotenoides son lípidos y siguen el mismo mecanismo de absorción como los triacilglicéridos de la dieta y otros componentes lipídicos menores. En la naturaleza la luteína no se encuentra generalmente en forma libre, si no que está esterificada con uno o dos ácidos grasos de cadena larga.

La información que se tiene en la literatura acerca del metabolismo de las xantofilas en especial de la luteína es limitada. Se sugiere que la hidrólisis de los enlaces éster de la luteína se tiene que llevar a cabo antes de la absorción en el intestino, es decir que los ésteres de luteína no son absorbidos al torrente sanguíneo con la misma eficiencia si no están desesterificados (Breithaupt *et al.*, 2002).

La práctica común industrial para producir esta desesterificación involucra la presencia de una base, presentándose una reacción exotérmica con baja selectividad, lo que trae como consecuencia reacciones indeseables y rendimientos bajos (Dossat *et al.*, 2002).

El proceso de manufactura convencional del pigmento comprende un paso de saponificación química. Para lograr la hidrólisis completa de los ésteres de luteína se aplican temperaturas superiores a los 80 °C y soluciones de hidróxido de sodio o potasio concentradas. Sin embargo, este procedimiento viene acompañado con daños múltiples al producto, gastos de energía altos y medidas de seguridad costosas. Una alternativa interesante para reducir estas desventajas es un proceso de desesterificación enzimática, pero la información en la literatura es escasa (Zorn *et al.*, 2003).

### **1.5 Lipasas como agentes de desesterificación.**

En el ser humano, una vez que se ingieren alimentos que contienen ésteres de luteína se lleva a cabo su hidrólisis a través de lipasas antes de la absorción. Estas enzimas son generadas por el páncreas y secretadas dentro del intestino.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3), están distribuidas en animales, plantas y procariotas e hidrolizan los ésteres del glicerol y los ácidos grasos de cadena larga. De esta manera, los triacilglicéridos y otras grasas lipolíticas de la dieta son sus sustratos naturales. La lipasa pancreática es la más conocida hasta ahora y también la más investigada de todas las enzimas lipolíticas. Esta enzima ha ofrecido grandes usos como una herramienta de investigación para la química de lípidos debido el tipo de reacciones que cataliza (Breithaupt *et al.*, 2002). Se utilizan comúnmente para catalizar tres reacciones principales: la hidrólisis de ésteres, la esterificación entre un alcohol y un ácido carboxílico y la transesterificación entre ésteres y grupos acilos donadores. Las

reacciones de las lipasas ocurren en la interfase entre la fase hidrofóbica que contiene los sustratos y la fase hidrofílica que contienen a las lipasas disueltas.

Para romper la barrera limitante causada por la naturaleza hidrofóbica de los sustratos, se han sugerido otros sistemas de reacción, entre los que se encuentra un sistema de reacción bifásico consistente en agua y en un solvente orgánico inmiscible, el sistema de reacción monofásica compuesto de un solvente orgánico y una cantidad mínima de agua, y finalmente el sistema de micelas inversas usando un solvente ó un lípido como fase continua y surfactante.

En cualquier caso, todos los sistemas de reacción utilizan solventes orgánicos, lo que impone limitaciones, como la necesidad de eliminar los solventes orgánicos residuales y las limitaciones prácticas debido a su precio, volatilidad, toxicidad e inflamabilidad (Shin *et al.*, 2002).

Sin embargo, aunque las lipasas en medio orgánico demuestran ventajas numerosas, su eficiencia catalítica está, es la mayoría de los casos varios órdenes de magnitud menor que en los sistemas acuosos (Secundo *et al.*, 2002).

En cualquier condición, las tendencias del mercado van encaminadas al uso de aditivos “naturales” para alimentos, lo cual da ventaja a la luteína hidrolizada enzimáticamente. De esta manera, si se logran obtener velocidades de reacción aceptables dará como resultado una alta producción de luteína libre siendo rentable para el establecimiento de un proceso eficiente a nivel industrial con enzimas comerciales (Zorn *et al.*, 2003).

Si bien es cierto que la enzima representa un costo considerable en la producción de luteína libre, esto se puede justificar pues se elimina la etapa de saponificación del proceso. Esto es, considerando que después de la extracción con solventes, se agrega álcali concentrado en solución acuosa.

Por otro lado, la enzima se puede encontrar inmovilizada en el tanque de extracción para reconocer el sustrato y llevar a cabo el proceso de hidrólisis. Con esto, se pueden disminuir los costos de producción de manera considerable, puesto que los procesos de extracción y reacción se llevarían a cabo en un solo equipo. La enzima al igual que el solvente, se puede volver a reutilizar. Como se menciono anteriormente el solvente más adecuado es el hexano por ser empleado en operaciones industriales actuales.

### **1.6 Justificación.**

La flor de cempasúchil es considerada como la principal fuente vegetal de extracción de luteína y zeaxantina. Siendo México el principal productor y exportador de flor fresca y harina de flor de cempasúchil a nivel mundial, ha pasado en la última década a producirse para consumo nacional.

Actualmente las fábricas productoras de carotenoides en México no procesan la flor de cempasúchil directamente, si no que compran la harina de flor a otros países (Bancomext, 2003). Por otro lado la producción anual de flor no alcanzaría para satisfacer la demanda (SAGARPA, 2003), ya que su uso principal es de ornato, acentuándose este uso los primeros días de noviembre y de manera menos importante como "medicamento alternativo" para aliviar algunos padecimientos. Perú es el principal exportador de harina de flor de cempasúchil, teniendo su máximo en 1999 con un valor para México cercano a los veinticinco millones de dólares. Otros países que también exportan a México esta harina, aunque en menor cantidad, son Tailandia y China.

Dada la importancia comercial para México del proceso de extracción de colorantes, en especial de luteína, por los motivos mencionados, en este trabajo se llevó a cabo la comparación entre tres procesos potenciales contra el proceso tradicional para determinar ventajas y desventajas en cada uno, así como llevar a cabo una primera estimación de la viabilidad (técnica y económica).

Este comparativo se llevó a cabo con el empleo del simulador comercial SuperPro Designer (Intelligen Inc.) debido a su disponibilidad y los múltiples beneficios que ofrece. Dentro del grupo de trabajo, se cuenta con datos experimentales de la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína que se utilizaron en este trabajo. Este simulador es usado principalmente para optimizar procesos integrados y realizar los análisis de sensibilidad correspondientes.

Por sus características, este simulador puede ser de gran utilidad para orientar el trabajo de laboratorio futuro (Petrides *et al.*, 2002 a y b).

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo General**

Establecer un comparativo de cuatro procesos (uno implementado a nivel industrial y tres en etapa de desarrollo usando enzimas) para la producción de luteína de flor de cempasúchil empleando el simulador SuperPro Designer (Intelligen Inc., NJ)

### **1.7.2 Objetivos particulares**

- ❖ Registrar los datos bibliográficos y experimentales con base en la información requerida por el simulador.
- ❖ Determinar los tiempos en que se obtiene el mayor rendimiento en cada uno de los procesos, con base en los datos utilizados en las simulaciones.
- ❖ Estimar cuál es el paso limitante para la obtención de luteína empleando la flor de cempasúchil y la harina de la flor.
- ❖ Proponer el proceso más rentable técnica y económicamente de acuerdo a los parámetros evaluados.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Colorantes y pigmentos.**

El color es uno de los atributos de calidad más importante para la aceptación de los alimentos por parte del consumidor. La impresión inicial de la calidad y aceptabilidad de un producto alimenticio es juzgada sobre la base de su apariencia visual. De esta manera, los colorantes alimentarios comúnmente utilizados, absorben la energía de la luz visible, proveen coloración y representan importantes constituyentes de calidad de los alimentos.

Dentro del reino vegetal, los pigmentos más importantes son las clorofilas y los carotenoides solubles en grasas. Esos pigmentos están ubicados en la naturaleza debido a su papel predominante en la fotosíntesis y la fotoprotección, encontrándose en todas las plantas superiores. Los pigmentos de los carotenoides son superados por los pigmentos verdes más dominantes de las clorofilas excepto durante el otoño, cuando el color amarillo-naranja de los carotenoides llega a ser evidente en las plantas.

Frecuentemente, los pigmentos son localizados o compartamentalizados en tejidos vegetales o animales. No obstante esos obstáculos, se han desarrollado excelentes metodologías y técnicas específicas para la extracción, separación, identificación y análisis cuantitativo de pigmentos o colorantes (Schwartz, 2002).

#### **2.1.1 Carotenoides.**

Los carotenoides han atraído por más de un siglo el interés de investigadores de diferentes áreas del conocimiento incluyendo la química, bioquímica, biología, ciencia y tecnología de los alimentos, medicina, farmacia y nutrición. Los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos, responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas, raíces, flores, pescados, invertebrados y pájaros. Los carotenoides ocurren invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores, aunque en este tejido fotosintético su color está enmascarado

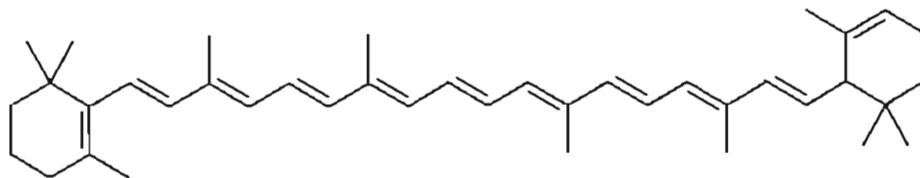
por el de la clorofila. También se encuentran en las algas, bacterias, hongos y levaduras. Se estima que la naturaleza produce aproximadamente 100 millones de toneladas de carotenoides al año.

La estructura básica de los carotenoides consta de un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras como hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides que ocurren naturalmente.

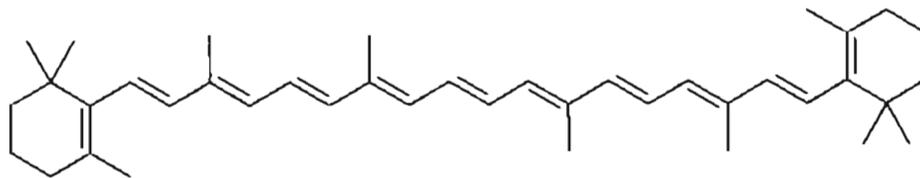
Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos. Aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas. Las funciones oxigenadas más comunes son los grupos hidroxilo (OH) y epoxi (epóxidos 5,6- ó 5,8-). También se encuentran los grupos aldehído (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO<sub>2</sub>H), carbometoxi (CO<sub>2</sub>Me) y metoxi (OMe).

Los carotenoides, ya sean carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos (ejemplo, fitoflueno,  $\xi$ - caroteno, licopeno), monocíclicos o bicíclicos. La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, formando uno o dos anillos  $\beta$  de seis miembros (a veces denominados  $\beta$ -iononas) o anillos  $\epsilon$  (algunas veces denominados  $\alpha$ -iononas). Así, el monocíclico  $\gamma$ -caroteno tiene un anillo  $\beta$  mientras los bicíclicos  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina y astaxantina tienen dos de estos anillos. Los bicíclicos  $\alpha$ -caroteno y luteína tienen cada uno un anillo  $\beta$  y un anillo  $\epsilon$ , como se puede observar en la Figura 1.

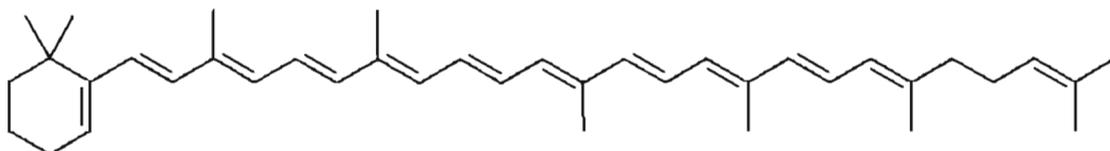
Carotenos:



$\alpha$ -caroteno

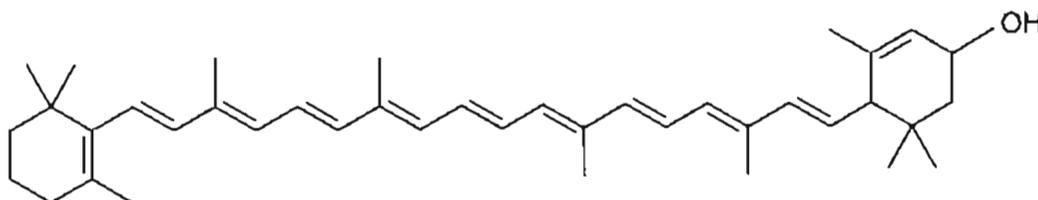


$\beta$ -caroteno

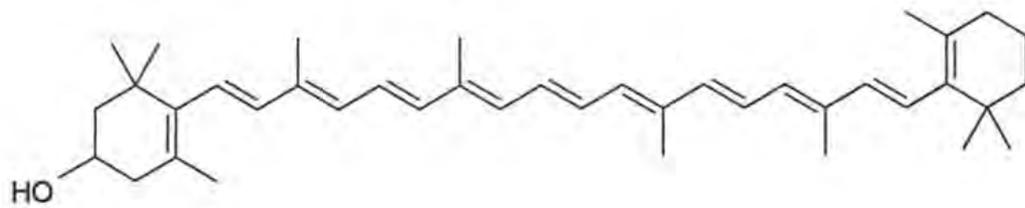


$\gamma$ -caroteno

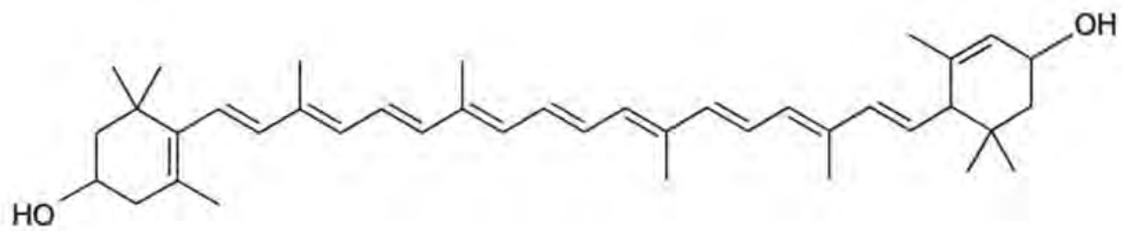
Xantofilas:



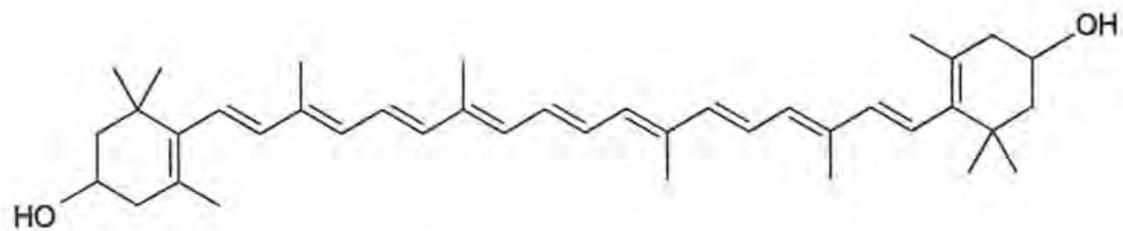
$\alpha$ -criptoxantina



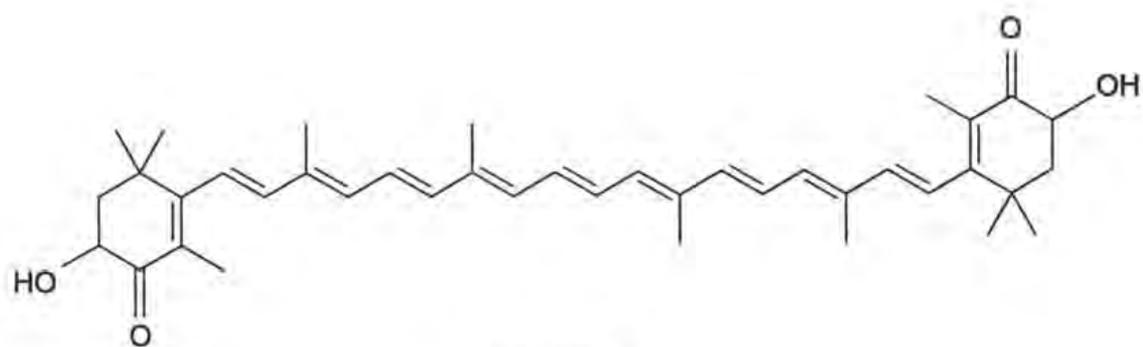
$\beta$ -criptoxantina



Luteína



Zeaxantina



Astaxantina

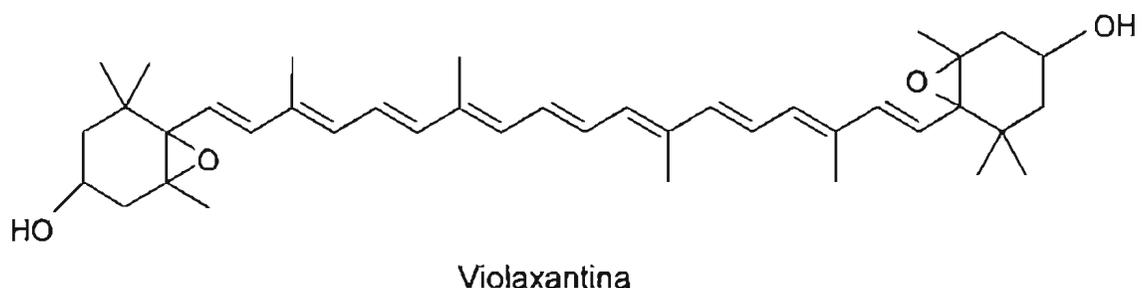


Figura 1. Estructuras químicas de algunos carotenos y carotenoides.

La luteína y la zeaxantina son también conocidas como trans-luteína y trans-zeaxantina. El término xantofilas se refiere a todos los oxi-carotenos (mono, di o poli oxi-carotenos) solos o en mezclas. Las xantofilas más comunes son la luteína y la zeaxantina.

Las xantofilas están distribuidas extensamente en el reino vegetal. Se encuentran en la parte del follaje verde de las plantas, frutas y flores. En general las xantofilas se encuentran como xantofilas libres (no esterificadas) en la parte verde de las plantas. Contrariamente, en las plantas y flores, como el cempasúchil, éstas se encuentran en forma de ésteres de ácidos grasos. La naturaleza de los ácidos grasos depende no solamente de las especies de las plantas, si no también de la variedad, condiciones climáticas, zonas geográficas y prácticas de agricultura.

La luteína y la zeaxantina, como los demás carotenoides, no son producidos por el cuerpo humano, por lo que es importante incluirlos en la dieta, a través de la ingesta de vegetales verdes y frutas. Algunos alimentos que son fuente de carotenos se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de carotenoides (mg/100g) en frutos y flores seleccionados (Schalch, 2003).

	Luteína	Zeaxantina	$\beta$ -caroteno	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno
<i>Vegetales (crudos)</i>						
Espinaca	9.5	0.4	3.3	np	np	np
Zanahoria	0.3	np	9.9	3.9	nd	np
Malz amarillo	0.5	1.6	0.2	0.2	nd	np
Pimiento naranja	0.5	1.6	0.2	0.2	nd	np
Pimiento rojo	np	2.2	3.3	0.5	1	0.1
Tomate	0.08	np	0.4	np	nd	1.6-5.6
<i>Frutas/flores</i>						
Mandarina	0.1	0.05	0.3	0.01	1.8	np
Durazno	0.08	0.04	0.08	Trazas	0.09	np
Cempasúchil	37	0.5	nr	nr	nr	nr

Abreviaciones: nd = no terminado; np = no presentado; nr = no reportado

### 2.1.1.1 Propiedades, funciones y acciones de los carotenoides.

La Figura 2 resume importantes propiedades físicas y químicas de los carotenoides. El rasgo estructural distintivo de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados, el cual consiste en una cadena poliénica. Esta parte de la molécula con propiedades cromóforas, es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia su capacidad de coloración.

Se requieren al menos siete enlaces dobles conjugados para que un carotenoide produzca color como en el  $\xi$ -caroteno, el cual es amarillo suave. El fitoflueno con cinco de tales enlaces es incoloro. El color se acentúa a medida que se extiende el sistema conjugado; así el licopeno es rojo. La ciclación causa algún impedimento, por tanto el  $\alpha$ -caroteno y el  $\beta$ -caroteno son de color naranja y rojo-naranja respectivamente, aunque tienen el mismo número de enlaces dobles conjugados que el licopeno (once). La intensidad y matiz de los colores en los alimentos dependen de cuales carotenoides están presentes, sus concentraciones y estado físico.

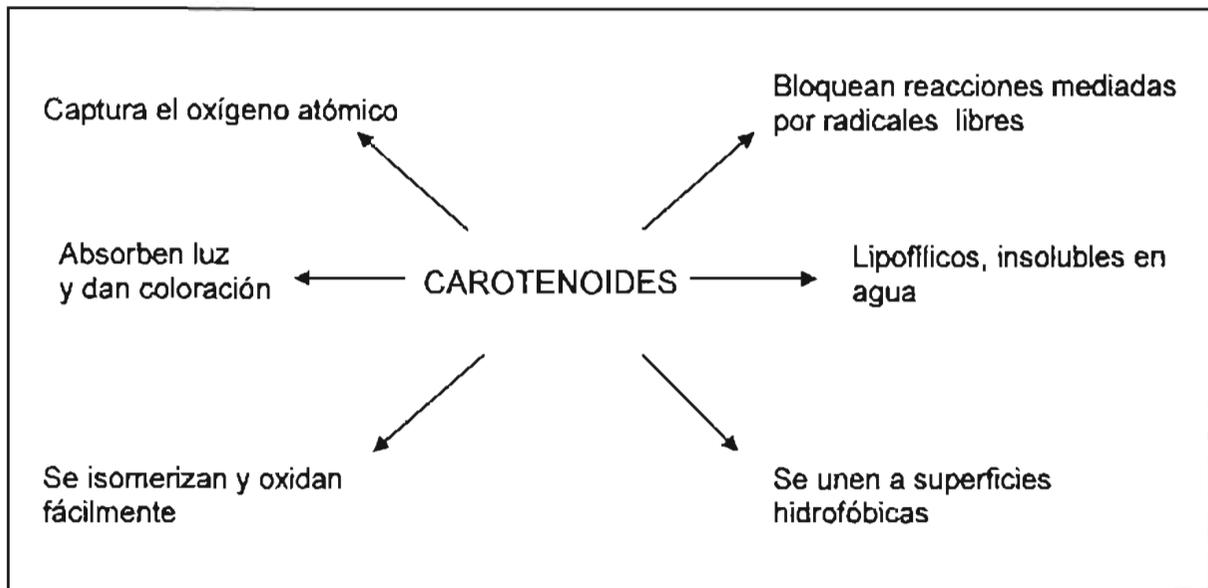


Figura 2. Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999).

Los carotenoides son sustancias hidrofóbicas y virtualmente insolubles en agua. Se disuelven en solventes orgánicos como acetona, alcohol, éter etílico, tetrahidrofurano y cloroformo. Los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano. Las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol. En plantas y animales, los carotenoides ocurren como cristales o sólidos amorfos, en solución en medios lipídicos, en dispersión coloidal o en combinación con proteínas en fase acuosa.

La asociación de los carotenoides con las proteínas, además de permitir el acceso a los medios acuosos, estabiliza el pigmento y cambia su color. Por ejemplo, en invertebrados tales como camarón, cangrejo y langosta, el carotenoide astaxantina está presente en forma de complejos carotenoprotéicos azules, verdes o púrpuras. En la cocción, la desnaturalización de la proteína libera la astaxantina y aparece el color rojo.

La importancia de los carotenoides en los alimentos va más allá de su papel como pigmentos naturales. En forma creciente se han atribuido a estos compuestos

funciones y acciones biológicas. De hecho, por mucho tiempo se ha sabido de la actividad de provitamina A de los carotenoides. La dieta proporciona la vitamina A en forma de vitamina A preformada (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinóico) a partir de alimentos de origen animal, como hígado, leche, productos lácteos, pescado y carne, o como carotenoides que se pueden transformar biológicamente a vitamina A (provitaminas A), generalmente a partir de alimentos de origen vegetal.

Se estima que aproximadamente el 60% de la vitamina A de la dieta proviene de las provitaminas A. Debido al costo generalmente elevado de los alimentos de origen animal, la ingesta de la provitamina A aumenta a un 82% en los países en desarrollo. También, la provitamina A tiene la ventaja de convertirse a vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así, la toxicidad potencial de una sobredosis.

Por otra parte, muchos factores influyen en la absorción y utilización de provitamina A, como la cantidad, tipo y forma física de los carotenoides en la dieta; la ingesta de grasa, vitamina E y fibra; el estado nutricional en relación a las proteínas y zinc; la existencia de ciertas enfermedades e infecciones por parásitos. Así, la biodisponibilidad de los carotenoides es variable y difícil de evaluar (Philip y Chen, 1988).

Los carotenoides también se han relacionado con una mejora del sistema inmune y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer (Hultén *et al.*, 2001), la enfermedad cardiovascular, la degeneración macular relacionada a la edad (Nishino *et al.*, 1999; Bone y Landrum, 2001; Mozaffarieh *et al.*, 2003) y la formación de cataratas (Figura 3). Estos efectos biológicos son independientes de la actividad de provitamina A y se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres (átomos o grupos de átomos que poseen un electrón no compartido) y la captura del oxígeno atómico.

La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado y los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección. El licopeno acíclico es más efectivo que el  $\beta$ -caroteno bicíclico. En resultados experimentales obtenidos con un sistema iniciado de radicales libres sugirieron que la cantaxantina y astaxantina, ambas con grupos ceto conjugados, son mejores antioxidantes que el  $\beta$ -caroteno y zeaxantina.

Debido a que la deficiencia de vitamina A sigue siendo un problema serio de salud pública en los países en desarrollo, las fuentes de la dieta de las provitaminas A continúan siendo motivo de preocupación. Por otra parte, el enfoque en el mundo desarrollado ha girado a los otros efectos de promoción de la salud de los carotenoides.

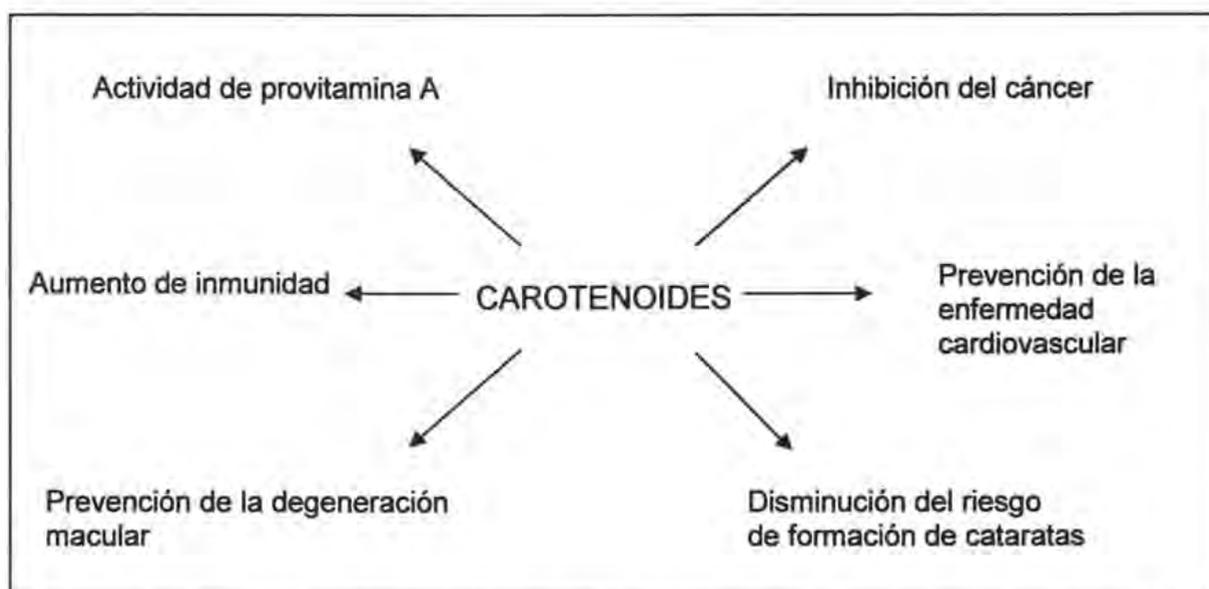


Figura 3. Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999)

La cadena poliénica es también irónicamente la causa de la inestabilidad de los carotenoides incluyendo su susceptibilidad a la oxidación (combinación con oxígeno) e isomerización geométrica (cambio de la geometría del enlace doble). El

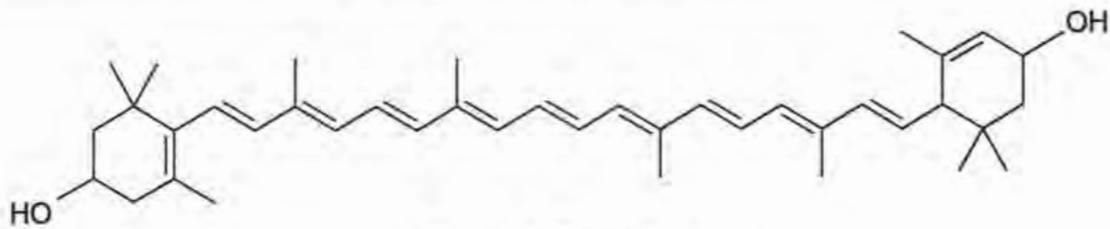
calor, la luz y los ácidos promueven la isomerización de los carotenoides *trans* (su configuración habitual en la naturaleza) a la forma *cis*. La oxidación, la causa principal de las pérdidas de carotenoides, depende del oxígeno disponible, los carotenoides involucrados y su condición física (Updike y Schwartz, 2003). La luz, el calor, los metales, las enzimas y los peróxidos estimulan la oxidación que es inhibida por los antioxidantes como tocoferoles (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C).

Se cree que durante la descomposición los epóxidos y apocarotenoides (carotenoides con un acortamiento del esqueleto carbonado) son los productos iniciales. Las subsecuentes fragmentaciones dan como resultado una serie de compuestos de bajo peso molecular similares a aquellos obtenidos durante la oxidación de los ácidos grasos. Es probable que existan las condiciones necesarias para la isomerización y oxidación de los carotenoides en la preparación de alimentos en el hogar, el procesamiento industrial y el almacenamiento de alimentos. Las consecuencias son la pérdida de color y de la actividad de vitamina A y de otras actividades biológicas. La degradación de los carotenoides también se ha asociado con el desarrollo de sabores desagradables (off-flavors) en los alimentos como en la zanahoria deshidratada y en la ralladura del camote (Rodríguez-Amaya, 1999).

#### **2.1.1.2 Luteína.**

La luteína ha sido uno de los carotenoides más extensamente estudiados en años recientes debido a que se reduce el riesgo del desarrollo de una variedad de padecimientos crónicos. Para comprender mejor a este carotenoide, es importante distinguir entre sus isómeros y apreciar las diferencias que existen entre las formas libres y esterificadas. Ver Figuras 4 y 5.

\*

Figura 4. *Trans* luteína

### **Cis-luteína**

*Cis*-luteína es el nombre genérico de una serie de derivados de la luteína obtenidos por la acción del calor y/o la luz por una reacción conocida como isomerización *cis-trans*.. La formación de derivados también depende de la actividad de agua y la cantidad de oxígeno disponible. Pueden existir varios productos de *cis*-luteína, pero los más comunes son los que se muestran en la Figura 5. Todas las formas de *cis*-luteína pueden ser derivadas de la luteína libre (también llamada luteína toda *trans*) o de ésteres de luteína.

La isomerización *cis-trans* es reversible, pero bajo ciertas condiciones ninguna *cis*-luteína puede revertir hacia la luteína toda *trans* original. Este tipo de reacciones de isomerización no son deseables, ya que se han reportado que los isómeros *trans* son pigmentos más efectivos debido a su gran estabilidad y su coloración rojiza (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997/a).

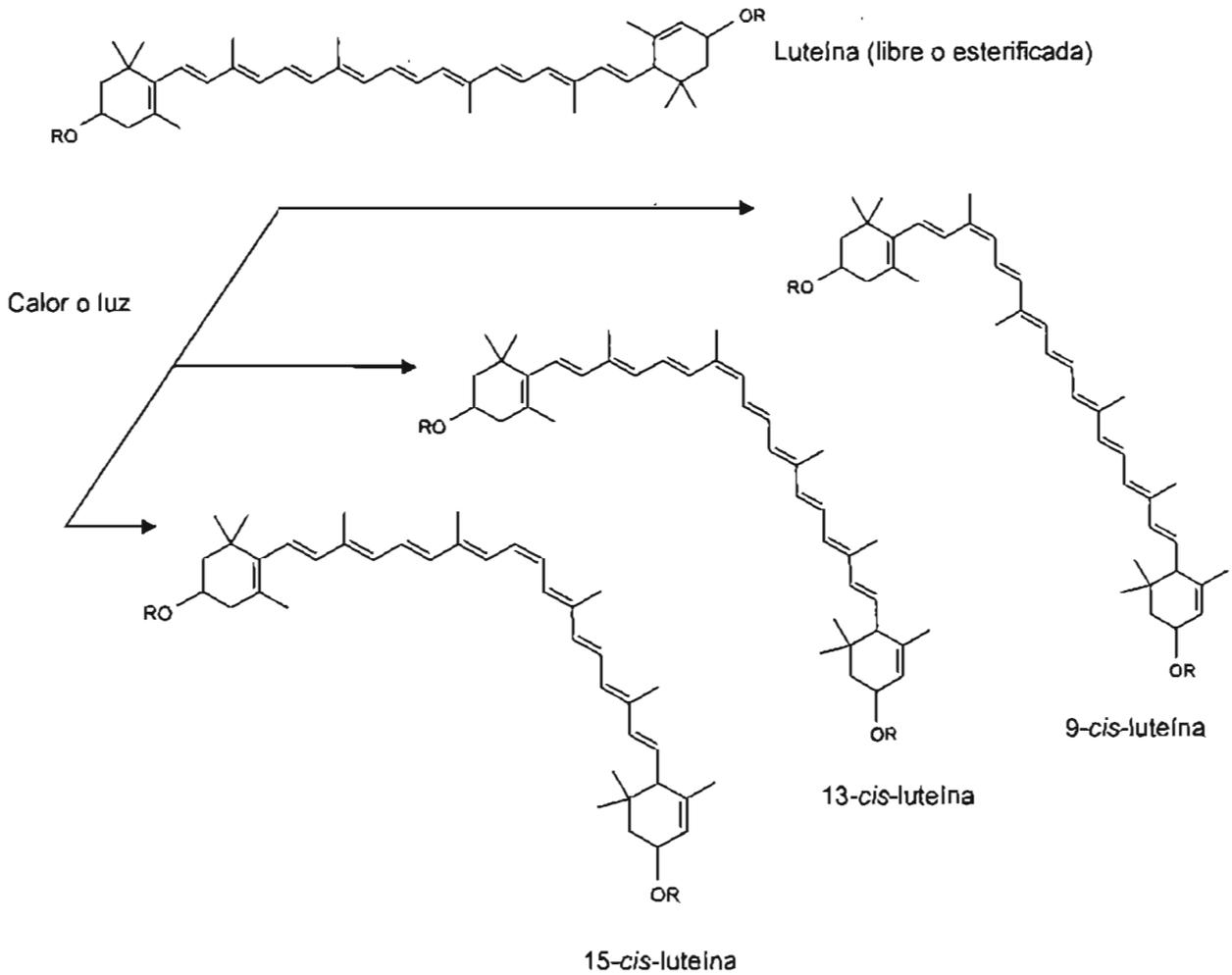


Figura 5. Isomerización de la luteína

**2.1.1.2.1 Biodisponibilidad de la luteína y de los ésteres de luteína.**

La biodisponibilidad es la fracción de un nutriente ingerido que está disponible para su utilización en funciones fisiológicas normales o de almacenamiento. La biodisponibilidad está basada principalmente en las mediciones de la concentración de los nutrientes en el suero o plasma después de su ingestión como una función del tiempo (Castenmiller y West, 1998).

Los estudios de biodisponibilidad han mostrado que la luteína es absorbida fundamentalmente en el cuerpo humano como luteína libre. Como en el caso para  $\alpha$  y  $\beta$  caroteno y las vitaminas liposolubles, la velocidad de absorción de la luteína ingerida en el torrente sanguíneo depende del contenido de grasas en la dieta (el incremento de la grasa es directamente proporcional a la absorción). Ha sido reportado que la biodisponibilidad relativa de la luteína de vegetales es mayor que la del  $\beta$  caroteno. Estos reportes indican que la cantidad de la fibra en la dieta afecta la absorción de luteína y carotenoides en general. Altos niveles de fibra tienen un efecto negativo sobre la absorción de carotenoides (Riedl *et al.*, 1999).

De la misma manera que los triacilglicéridos y las grasas son hidrolizadas en el tracto digestivo para que los correspondientes ácidos grasos sean absorbidos, los ésteres de luteína son también hidrolizados a luteína libre, la cual es absorbida en el suero sanguíneo. Las enzimas conocidas como esterases y lipasas llevan a cabo esta acción en el tracto digestivo. Esas enzimas son producidas en el páncreas por un mecanismo que es regulado por la presencia de grasas en el estómago y en el duodeno. Como en el caso de la luteína libre, la biodisponibilidad de los esterres de luteína es también incrementada por el contenido de grasas en los alimentos (Roodenburg *et al.*, 2000).

#### **2.1.1.2.2 La Luteína en la piel.**

Los ésteres de carotenoides con ácidos grasos se encuentran en frutas y vegetales. En estudios recientes se ha demostrado que hay presentes pequeñas cantidades de ésteres de carotenoides en la piel. Identificados como luteína, zeaxantina, 2'-3'-anhidroluteína,  $\alpha$ -criptoxantina y  $\beta$ -criptoxantina. Basados en la comparación con compuestos de referencia sintéticos, varios carotenoides mono y diesterificados con ácidos grasos fueron asignados tentativamente. Éstos van desde ácido linoléico hasta ácido esteárico; los niveles de los carotenoides en la piel son bajos, en el rango de pmol/g de piel. Por ejemplo, la concentración de  $\beta$ -

caroteno es varios órdenes de magnitud mayor que la concentración de las xantofilas.

Los ésteres de carotenoides en la piel pueden ser formados por la re-esterificación de las xantofilas después de la absorción. Por otro lado, en la sangre pueden circular pequeñas cantidades de ésteres y consecuentemente éstos se acumulan en los tejidos como en la piel. La acumulación de los carotenoides en la piel ha atraído la atención, desde que se sugirió que los carotenoides pueden contribuir a la protección contra la exposición a los rayos UV. De cualquier modo, los efectos protectores de los carotenoides para las lesiones en la piel están aún bajo investigación (Wingerath *et al.*, 1999).

#### **2.1.1.2.3 La luteína en la mácula visual.**

En 1945, el pigmento macular fue tentativamente descrito como consistente de "luteína xantofila". De cualquier modo, no fue sino hasta 1985 y 1988 que fue confirmado finalmente que consistía de luteína y zeaxantina. En 1993, fue identificado un tercer carotenoide principal, el estereoisómero de la zeaxantina 3R, 3'S (=meso)-zeaxantina. A diferencia de la luteína y la zeaxantina, este carotenoide no se encuentra en alimentos o sangre en cantidades sustanciales (Wald, 1945; Bone y Landrum, 1985; Handelman *et al.*, 1988).

En términos de la distribución de la retina, el pigmento macular aparece localizado en las fibras de Henle, axones de los fotorreceptores, que es una localización apropiada para escudar los fotorreceptores de la luz azul. Sin embargo, el conocimiento de la localización ultraestructural/subcelular detallada de los carotenoides en el tejido de la retina es aún incompleta, pero interesante y emergente (Handelman *et al.*, 1988).

El mecanismo exacto de salida de la luteína y la zeaxantina en la retina han sido difíciles de describir y la existencia o ausencia de enlaces protéicos como intermediarios en este proceso no es clara. Los investigadores han sugerido que la tubulina retinal puede ser la principal sustancia enlazante de carotenoides en la retina. De cualquier modo, la carencia de especificidad de esta sustancia sugiere que esto sólo puede estabilizar pasivamente a la zeaxantina y a la luteína en la fovea, probablemente en la misma forma que la actina estabiliza la astaxantina en el músculo del salmón.

El conocimiento de la distribución de los carotenoides maculares en la retina ha avanzado. En estudios recientes (Landrum y Bone, 2001; Schalch, 2003), se hicieron cortes en áreas específicas en retinas humanas. Esta disección produjo un disco central conteniendo una mancha amarilla (área 'central') más dos discos concéntricos, de los cuales uno es el área media ('medial') y el otro contiene la retina periférica (área 'externa'). Esas áreas fueron sujetas a análisis utilizando HPLC. Los dos estereoisómeros de zeaxantina, 3R, 3'R-zeaxantina y 3R, 3'S(=meso)-zeaxantina dominan el área central. De vez en cuando la luteína es relativamente más abundante en la retina periférica, en las áreas medial y externa. La relación de la luteína con respecto a la zeaxantina total es cerca de 0.8 en el centro de la mácula y cerca de 2.4 de la periferia de la retina.

De esta manera, por mecanismos que son poco conocidos, no solamente se acumula luteína y zeaxantina específicamente en la mácula, sino también se invierten las relaciones de concentraciones de los dos carotenoides normalmente encontrados en la sangre, haciendo a la zeaxantina dominante en el centro de la mácula y a la luteína dominante en la retina periférica (Landrum y Bone, 2001; Schalch, 2003).

#### 2.1.1.2.4 Aplicaciones de la luteína.

Como se ha visto a lo largo de este capítulo, la luteína tiene propiedades como antioxidante y colorante teniendo una gran gama de aplicaciones, que van desde alimento para peces y aves de ornato, hasta auxiliares en algunos padecimientos, de manera especial para algunos tipos de cáncer.

En Asia, específicamente en China y Japón, la luteína es importante por incrementar el color de los peces dorados (*Carassius auratus*), donde se han hecho estudios encontrándose que la luteína está entre los carotenoides más abundantes de las escamas, por lo que se le atribuye a ésta la coloración amarillo naranja que tiene este tipo de pez de ornato (Ohkubo *et al.*, 1999).

Los carotenoides son componentes importantes en el plumaje de las aves. Los precursores metabólicos están en la dieta originalmente pero muchas especies tienen la capacidad de modificar químicamente y depositar selectivamente esos pigmentos. Los amarillos brillantes, anaranjados y rojos, son debidos principalmente a la presencia de xantófilas, ceto e hidroxí carotenos. Algunos son depositados sin modificaciones (luteína) mientras que otros son modificados químicamente (cantaxantina y astaxantina) (Brush, 2000).

Ciertos tipos de aves de plumaje amarillo como el canario (*Serinus canarius*) y la guacamaya (*Ara macao*), o que cuentan con un pronunciado pico amarillo, como el tucán (*Ramphastos sulfuratus*) requieren una ingesta de carotenoides, que normalmente obtienen de flores y frutos. Estos contienen un gran porcentaje de carotenoides que tienen en su mayoría luteína. Por ésto es que algunos alimentos especiales para este tipo de aves considerados de ornato, contienen luteína dentro de su formulación (Surai *et al.*, 2001).

Para la industria avícola, la luteína es de gran importancia. La dieta de los pollos en las granjas productoras de huevo puede variar de acuerdo al fin al cual estén

destinados los animales. Hay dos tipos de pollos, los de engorda, de los cuales se aprovecha su carne, y ponedoras de los cuales se aprovechan los huevos. Estudios de mercado en diferentes países muestran que existe correlación entre el tono e intensidad de la pigmentación del pollo y el huevo, y la percepción de calidad de estos productos y consecuentemente el precio de venta de los mismos (Martín-Garmendia *et al.*, 1981).

Información nutricional indica que una dieta rica en vegetales y frutas puede reducir el riesgo de un gran número de padecimientos crónicos, incluyendo cáncer, padecimientos cardiovasculares, diabetes y degeneración macular relacionada con la edad. Varios compuestos en plantas comestibles, tales como carotenoides, vitaminas antioxidativas, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, indoles y fibra han sido considerados responsables de la reducción del riesgo.

Los carotenoides han sido estudiados minuciosamente y se han probado diversos efectos benéficos sobre la salud humana. Inicialmente, se sugirió que los carotenoides presentes en los vegetales y frutas sirven como precursores de vitamina A. Se ha reportado que el  $\beta$ -caroteno puede tener un efecto protector contra el cáncer sin convertirse en vitamina A. Entonces, otros carotenoides aparte del  $\beta$ -caroteno pueden también contribuir en la protección del cáncer y de varios padecimientos (Hultén *et al.*, 2001; Nishino *et al.*, 2002).

### **2.1.2 La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.).**

El cempasúchil, también conocida como flor de muertos, clavelón, copetuda ó clavel de la india (cempasúchil viene del náhuatl *cempoalli*, veinte, el número máximo del sistema vigesimal y *xóchitl*, flor) es una planta nativa de México. Esta planta herbácea anual alcanza da 50 a 60 cm de altura, sus hojas son opuestas, divididas y sus flores son olorosas de 5 a 6 cm de diámetro dobles (Figura 6).

Desde el punto de vista taxonómico se incluye dentro de la familia de las Compuestas, en la tribu Tageteae. Entre los géneros de esta tribu, destacan por su mayor diversidad y número de especies *Dyssodia* y *Tagetes* (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997/b).

El género *Tagetes* consta de 43 especies americanas, algunas introducidas en Asia y Australia. En América se distribuyen desde las latitudes 36N -36S, del sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, en regiones montañosas, áridas y frecuentemente en hábitats desde moderadamente elevados hasta 4500 metros, siendo el centro y el sur de México su área de mayor diversidad (Vasudevan *et al.*, 1997).



Figura 6. Flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.)

De las veinte variedades de *Tagetes*, la mexicana *Tagetes erecta*, es una planta herbácea, erecta y anual que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Sus hojas son

opuestas, divididas, dentadas y olorosas (aromáticas); con flores grandes (5 ó 6 cm de diámetro) de color anaranjado, amarillento ó rojizo y de olor penetrante.

Los floricultores siembran la flor entre los meses de mayo y junio para florecer alrededor del mes de octubre y noviembre. Se cultiva en nuestro país principalmente para fines ornamentales en ciertas ceremonias que se dedican en el mes de noviembre para adornar los panteones y "altares de muertos", teniendo una aplicación secundaria como materia prima para la industria alimentaria. También es utilizada para obtener pigmentos (xantofilas) puros empleándose como colorantes para la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos.

Los carotenoides en las flores se encuentran esterificados comúnmente con ácido láurico, mirístico, palmítico y esteárico en diferentes proporciones, los cuales son fácilmente solubles en hexano (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997/b).

## 2.2 Modelos de simulación de procesos.

Los recientes avances en biotecnología han permitido contribuir a que la producción de nuevos materiales biológicos sea eficiente a gran escala. Como consecuencia de esto, hay un creciente interés en la formulación de metodologías para el desarrollo de programas computacionales que puedan facilitar el diseño de procesos y desarrollo de procesos bioquímicos novedosos. Algunas metodologías y herramientas pueden ser usadas para 1) crear proyectos, ideas y enfoques a más de un objetivo; 2) facilitar la comunicación entre varios grupos involucrados en el desarrollo de procesos; 3) diseñar protocolos experimentales, interpretar dichos resultados y reducir el tiempo requerido para el desarrollo de los procesos; 4) diseñar procesos a gran escala y 5) optimizar la operación de los procesos, minimizando los costos de producción (Petrides, 1994; Pascal *et al.*, 1995; Petrides *et al.*, 1995).

Los programas de simulación de procesos son series de algoritmos de computación capaces de modelar matemáticamente el desempeño de operaciones unitarias individuales. Cada modelo puede describir varios fenómenos, ya sean físicos, químicos o biológicos, y puede contener la información en su base de datos, que va desde las propiedades de materiales y equipos que se requieren, hasta cada una de las operaciones unitarias involucradas en el proceso (Shanklin *et al.*, 2001).

Se han confirmado las ventajas de la simulación para el desarrollo, evaluación y escalamiento de bioprocesos. Esto permite llevar a cabo comparaciones de procesos alternativos sobre una base consistente de diseño, pero con un gran número de ideas que pueden ser creadas y analizadas interactivamente en poco tiempo. Las simulaciones de procesos integrados son también capaces de estudiar las interacciones existentes entre los procesos de producción (upstream) y purificación (downstream) de productos de interés comercial (Rouf *et al.*, 2001; Petrides *et al.*, 2002/a).

### 2.2.1 Surgimiento y desarrollo.

Tradicionalmente, los programas de simulación de procesos han sido usados en la industria química y petroquímica. El desarrollo industrial de algunos programas empezaron en la década de los 50's, desarrollándose primero de modo casero por compañías que buscaban aplicaciones comerciales. En aquel tiempo, fueron desarrollados los modelos de destilación extensiva, extracción y equilibrio líquido-gas. Los programas estaban diseñados para simular procesos de síntesis química pero considerablemente incapaces de simular las operaciones biotecnológicas (Petrides *et al.*, 2002/b).

Éstos son algunos cambios que surgieron a partir de las necesidades de los programas de simulación de procesos para su aplicación a procesos biotecnológicos. Primero, se integran las operaciones unitarias tales como fermentadores, homogenizadores, centrifugas, filtros y columnas cromatográficas. Esas operaciones unitarias no son siempre bien caracterizadas y sino enfocadas hacia fenómenos físicos y biológicos, limitándose solamente a los principios de equilibrio de fases. Posteriormente, los bioprocesos también involucraron materiales y productos no definidos como células y proteínas, para los cuales las propiedades físicas o algunas estructuras pueden no ser conocidas. Adicionalmente, los sustratos de composición variante o desconocida tal como la harina de soya o el extracto de levadura son comúnmente usadas en la alimentación de los procesos. A continuación, la industria farmacéutica generalmente utiliza al mismo tiempo operaciones por lote y semi-continuo. Esta superposición entre los dos tipos de sistema puede traer dificultades para trabajar las simulaciones de una manera precisa.

Finalmente, los pasos de limpieza y esterilización del equipo y los productos finales son necesarios para la fabricación de productos farmacéuticos aceptados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA) (Petrides *et al.*, 2002/b).

El desarrollo de programas de simulación para la industria biotecnológica se ha dado desde hace sólo 10 a 15 años. Debido a este reciente desarrollo es que la información publicada es muy limitada. Ésta se refiere solamente a recomendaciones de vendedores de programas con respecto al producto que ofertan o documentos de académicos/industriales que han tenido un avance de sus modelos o a los avances en la simulación en operaciones unitarias específicas (Shanklin *et al.*, 2001).

Desde sus primeras comercializaciones, los simuladores han ido avanzando en aplicaciones industriales. Actualmente se utilizan para analizar desde la incorporación de una nueva línea de producción, hasta la implementación de una planta de procesos; desde la construcción del inmueble hasta dejarla lista para su operación. Compañías como Aventis, Bayer y DuPont, han optado por utilizar el simulador comercial Aspen Plus, mientras que Baxter, Roche y Novo Nordisk prefieren la aplicación del programa SuperPro Designer para el análisis de factibilidad de sus nuevos proyectos. Así, estos son los dos simuladores comerciales más comúnmente usados (Shanklin *et al.*, 2001).

### **2.2.2 Simuladores comerciales.**

En el mercado se encuentran disponibles varios simuladores para la industria química, destacando entre los programas disponibles en el mercado el Aspen Plus (ABP) y el SuperPro Designer (SPD). Un sin fin de industriales y académicos han optado por la utilización de estos dos programas debido a que son muy accesibles en su operación ya que utilizan Windows como su ambiente de trabajo, pudiendo mostrar sus resultados, en tablas y gráficos que hacen de fácil comprensión y análisis los datos resultantes.

AspenTech fue fundada en 1981 para comercializar la tecnología desarrollada por los proyectos del Sistema Avanzado para la Ingeniería de Procesos (ASPEN) en el

Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT). AspenTech se hizo pública en Octubre de 1994 y su simulador ha sido adquirido por compañías líderes industrialmente como parte de una estrategia integral para la industria de procesos.

Intelligen fue fundada en 1992 para comercializar tecnología de diseño de procesos asistido por computadora, la cual fue desarrollada en el Centro de Ingeniería y Biotecnología de Procesos (BPEC) que al igual que AspenTech pertenece al Instituto Tecnológico de Massachusetts.

Existen otros programas con un uso menor que modelan procesos químicos, los cuales incluyen a ENPRO (Simulation Science Inc., Brea, CA, USA), ESP (OLI Systems Inc., Morris Plains, NJ, USA), GPS-X y Sim Works (Hydromantis Inc., Hamilton, Ontario, Canadá) y TOXCHEM + (Enviromega LTd., Flamborough, Ontario, Canadá). Estos programas tienen aplicaciones más restringidas, lo que hace que su uso sea limitado y poco conocido (Flora *et al.*, 1999).

### **2.2.3 Simulación de procesos biotecnológicos utilizando el SPD.**

El éxito de los proyectos biotecnológicos desde su aparición hasta su aplicación en el ámbito comercial ha sido crucial. La experiencia muestra que las elecciones primarias en el desarrollo de los procesos comúnmente han dificultado los cambios después, debido a las limitaciones regulatorias para la modificación de los procesos. El resultado conduce a soluciones sub-óptimas para los problemas de diseño de procesos. Esto puede poner trabas a la viabilidad e incrementar costos del producto.

Los simuladores de procesos auxiliados por computadora son herramientas para planear, diseñar, optimizar y evaluar procesos químicos, y han sido adaptadas a procesos bioquímicos. La simulación de procesos involucra la preparación de

diagramas de flujo de procesos, resolviendo los balances de materia y energía correspondientes basados en los datos propuestos o en la estimación de parámetros ya integrados, las estimaciones de costos totales y en la sensibilidad de análisis para asumir los cambios. La simulación de procesos puede proveer vínculos entre el descubrimiento de un compuesto y los pasos iniciales en el desarrollo. Esto es especialmente efectivo cuando se utiliza primeramente para el desarrollo de procesos novedosos (Steffen *et al.*, 1996).

EL SPD es extremadamente versátil y exhibe muchos de los atributos requeridos para aplicaciones prácticas. Este programa puede simular diferentes tipos de reacciones cinéticas y unidades de procesamiento, haciendo posible estudiar varias configuraciones del proceso. El impacto visual es proporcionado primeramente por los diagramas de flujo producidos por el usuario sobre una hoja de trabajo.

El programa proporciona una documentación comprensible de resultados, los cuales pueden ser producidos desde una plantilla de cuatro categorías: reporte de flujos, reporte de evaluación económica, reporte de estimación de impacto ambiental y reporte de datos de entrada. Los simuladores pueden ser completados en varios segundos o en algunos minutos dependiendo de la complejidad del diagrama de flujo y de la velocidad de la computadora (Flora *et al.*, 1999).

El SPD es un asistente en el diseño de escalamiento de un proceso desde el laboratorio hasta la productividad deseada en planta. El programa contiene modelos para una serie de operaciones unitarias y reactores comúnmente usados en bioprocesos. Estos pueden ser combinados usando una interfase gráfica para sintetizar un diagrama de flujo. El usuario puede proveer la estequiometría y conversión para cada reacción, así como el rendimiento de los procesos de separación; el programa resuelve los balances de masa y energía, el tamaño del equipo, estima los costos de compra, y reporta los datos de flujo y equipo, así como los costos de capital y manufactura.

El SPD consta de tres componentes principales: La interfase, el componente sintético y el componente analítico (Figura 1). La interfase y el componente analítico está escrito en lenguaje de programación THINK C. El componente sintético fue implementado usando el sistema experto integrador Nexpert Objet (disponible por Neuron Data, California).

La interfase del SPD es completamente gráfica y elimina la necesidad del elaborar archivos de entrada creados en FORTRAN que se requieren para otros simuladores de procesos. El inicio de un diagrama de flujo es hecho a través de una ventana de dialogo apropiada y todas las actividades son ejecutadas desde el menú y/o con el ratón de la computadora. El usuario promedio de SPD es un ingeniero químico o bioquímico, el cual tiene cierta experiencia en el diseño de procesos pero no necesariamente una experiencia en programación. El SPD tiene ayuda avanzada que facilita y minimiza la necesidad de manuales escritos. La interfase del usuario está equipada con un graficador para representar los resultados de una manera sencilla tanto para la calendarización de los procesos como para la ejecución dinámica de operaciones unitarias por lote.

Durante una sesión, el usuario puede a través de diálogos con el sistema, proveer información acerca de las propiedades del producto (por ejemplo; solubilidad, peso molecular, localización, punto isoeléctrico, etc.), las propiedades de la producción de microorganismos (por ejemplo; la densidad, tamaño de partícula promedio, morfología, etc.), las propiedades de los contaminantes comerciales, etc. En la versión actual del SPD, el resultado de una sesión es un diagrama de flujo factible el cual puede ser transferido a componentes analíticos para su análisis y evaluación.

El SPD está escrito en lenguaje de programación C, el cual puede usar estructuras de datos avanzadas y localización de memoria dinámica. Como una consecuencia, el SPD puede tener cualquier número de operaciones unitarias, flujos de materiales y componentes químicos debido a que la memoria de todos

los objetos está localizada en una sola corrida. Los balances de materia en el SPD están estimados en un acercamiento modular secuencial. Las operaciones unitarias de un diagrama de flujo son secuenciadas de acuerdo al orden de cálculo. Todos los modelos de las operaciones unitarias estiman la composición y velocidad de flujo de las salidas dadas de acuerdo a los flujos de entrada e información de ingeniería específica. El SPD está conectado a un módulo de base de datos que guarda los datos de propiedades físicas de un gran número de compuestos químicos y biológicos. El componente analítico del SPD genera reportes detallados de balances de materia y de evaluación económica. La arquitectura básica se presenta en la Figura 7.

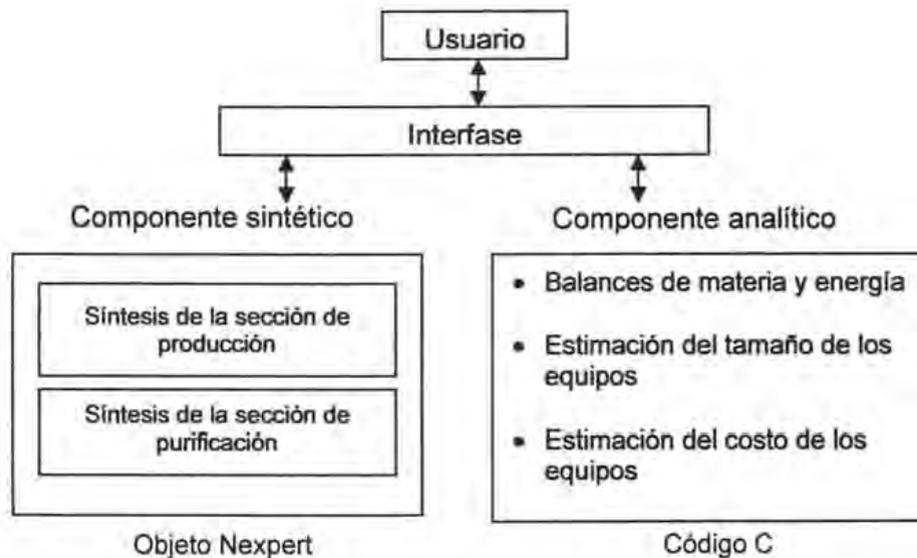


Figura 7. Sistema de Arquitectura del SPD

### 3. METODOLOGÍA DEL TRABAJO.

#### 3.1 Aspectos comerciales.

Para establecer la base de producción de los procesos por comparar fue necesario que se revisaran los datos de importación y exportación, y así tener una idea más clara de la demanda de la harina de flor de cempasúchil. También se llevó a cabo una revisión de las exportaciones para verificar si México era un exportador potencial de esta materia prima después de ser por mucho tiempo el principal productor de la flor.

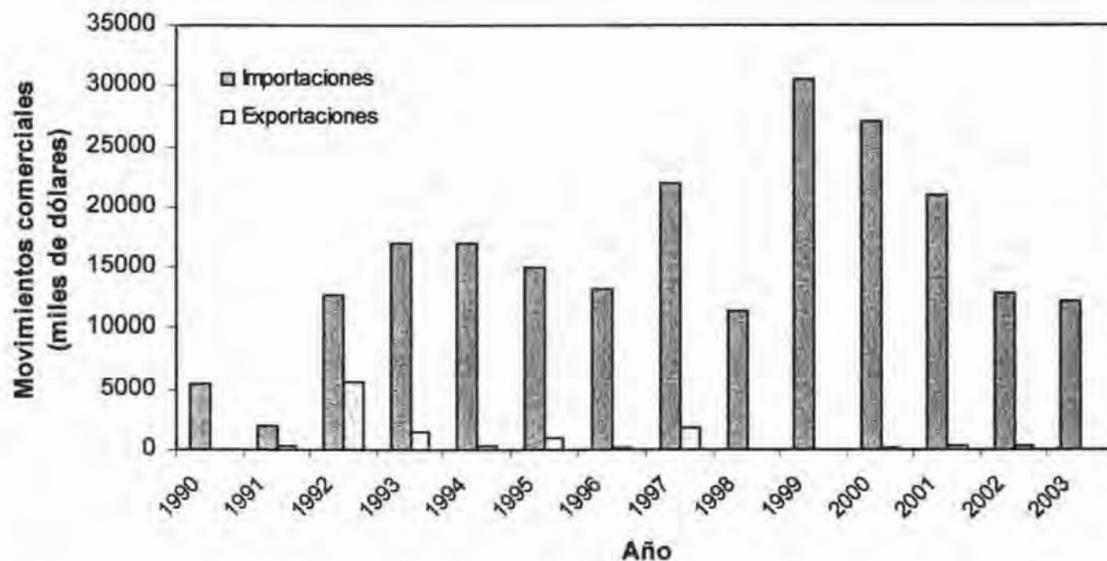


Figura 8. Valor de los movimientos comerciales (importaciones y exportaciones) de la harina de flor de cempasúchil, de 1990 a Octubre del 2003, incluida la tasa de inflación bajo la fracción arancelaria 1404.10.01 (Bancomext, 2004).

Como se puede apreciar en la Figura 8, las importaciones de la harina de la flor de cempasúchil han sido considerables en los últimos años, notándose un máximo en 1999 con más de 30 millones de dólares, siendo Perú el principal socio comercial.

Este país ha sido en los últimos años el principal productor de América Latina de la harina, por tener las condiciones ideales para su cultivo.

A nivel mundial China es el principal productor de harina. Tan sólo de enero a octubre del 2003 exportó a nuestro país 240 toneladas, siendo el segundo proveedor de México. Aunado al clima también es necesario hacer notar que tiene mucho que ver la mano de obra barata que hay en ambos países, lo que lleva a precios unitarios estables en los últimos doce años (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento histórico de las importaciones de harina de flor de cempasúchil y la variación del precio por kilogramo por año, hasta octubre del 2003 (Bancomext, 2004).

Año	I M P O R T A C I O N E S		
	Volumen (toneladas)	Valor (miles de dólares)	Precio por kilogramo (dólares)
1991	1360	1936	1.42
1992	4346	12743	2.93
1993	7301	17077	2.34
1994	9510	17038	1.79
1995	8732	14999	1.72
1996	6552	13271	2.03
1997	10799	22026	2.04
1998	4901	11366	2.32
1999	12443	30479	2.45
2000	10853	27133	2.50
2001	6590	20958	3.18
2002	5426	12851	2.37
2003	6246	9441	1.51

### 3.2 Producción nacional.

En la Figura 7 se puede apreciar una disminución de las importaciones en los últimos dos años. Sin embargo la producción nacional de flor en los últimos años ha disminuido drásticamente (Figura 9). Esto se puede deber en gran medida a los problemas agrarios aunado a los cambios climatológicos que se han presentado en tiempos recientes (SAGARPA, 2004).

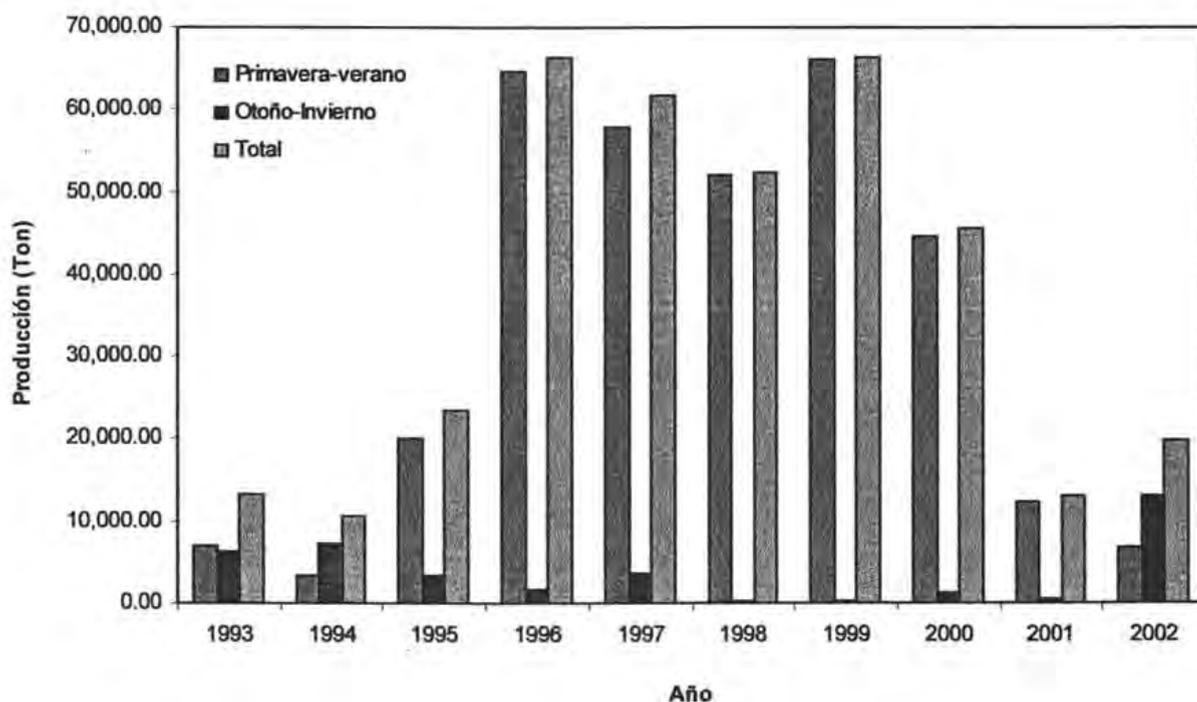


Figura 9. Comportamiento histórico de la producción nacional de cempasúchil en el año agrícola de 1993-2002, dividido en primavera-verano y otoño-invierno y total (SAGARPA, 2004).

### 3.3 Cálculo de la base de producción.

Para determinar la proyección económica, se obtuvo la tendencia de la demanda de flor de cempasúchil; esto se llevó a cabo empleando el procedimiento de mínimos cuadrados, un método de pronósticos que sirve para realizar previsiones de ventas, establecer requisitos de inventario o tendencias de los consumidores, entre otros.

Se calculó una proyección para el año 2015, de las importaciones de harina de flor de cempasúchil, suponiendo que el total de las importaciones se utiliza para la producción de luteína (Figura 10).

Se proyectó una importación de 6,827 toneladas, estableciendo que los nuevos procesos propuestos en este trabajo cubrirán un 30% de la demanda nacional y la cantidad de harina de flor de cempasúchil que se tendría que procesar para producir luteína al año sería de 2,048 toneladas. Este dato se introdujo al simulador considerando el número de lotes por año y dependiendo del tipo de proceso simulado. Con esto se determina la capacidad de la planta, condicionando el tamaño de los equipos.

En este proyecto se contempla la comparación de varios métodos de extracción de luteína, uno de los cuales contempla a la flor fresca como materia prima, por lo que es necesario calcular cuanta flor se necesita para obtener la cantidad equivalente de harina. Esto es con el fin de homologar las cantidades agregadas al simulador y calcular el rendimiento de la extracción con cantidades iguales para posteriormente realizar el estudio comparativo teniendo alimentaciones constantes.

Comportamiento histórico y proyección hasta el año 2015 para la importaciones de harina de flor de cempasúchil

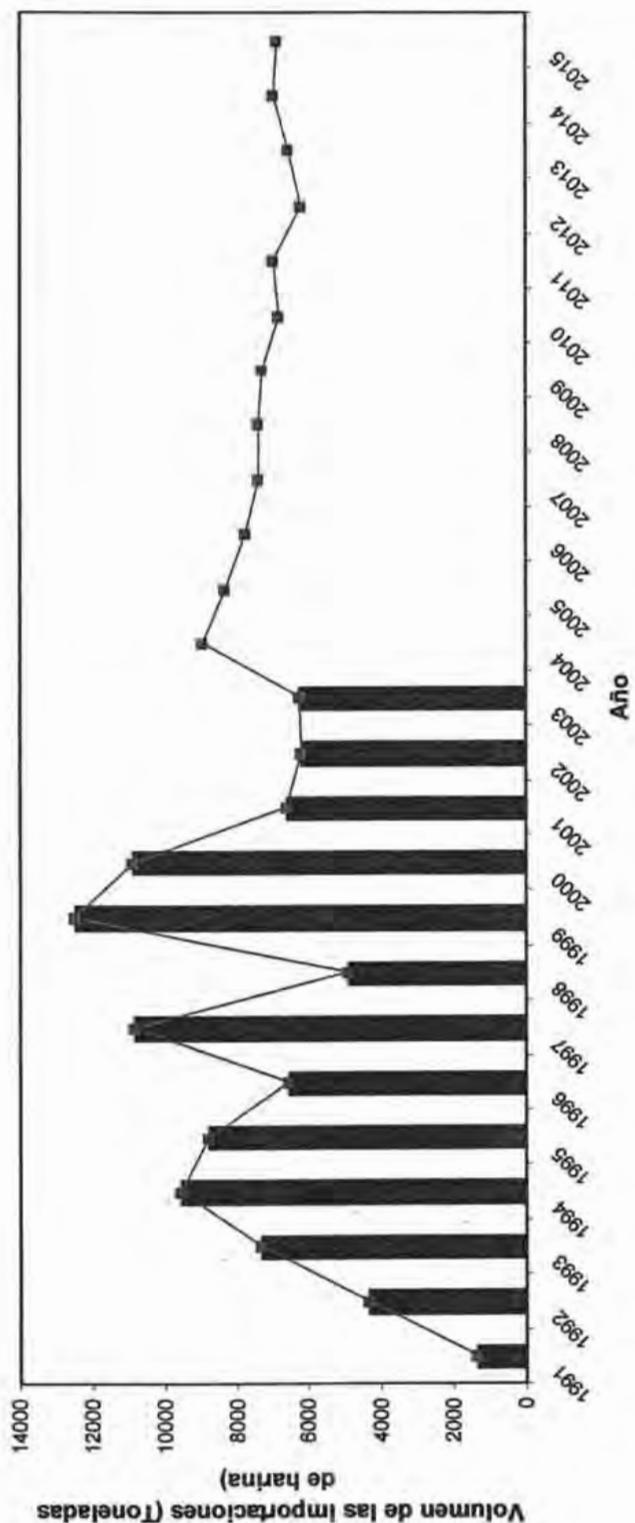


Figura 10. Comportamiento histórico y proyección hasta el año 2015 para las importaciones de Harina de Flor de Cempasúchil.

### 3.4 Operación general del simulador SuperPro Designer (SPD).

Para utilizar el simulador se tienen que seguir ciertos pasos:

1. Al iniciar el simulador, hay que definir el modo de operación del proceso que se desea diseñar. Este puede ser continuo o por lotes.
2. Registro de los compuestos y mezclas que se vayan a ocupar y que no estén declarados en el programa. Hay que introducir las propiedades físico-químicas de cada uno de los compuestos, así como características económicas que puede ser el precio de compra o de venta, dependiendo del material, si es reactivo o producto.
3. Construcción del diagrama de flujo. Selección de las operaciones unitarias necesarias que conforman el proceso. Si no se tiene total dominio de las operaciones unitarias, el programa cuenta con un manual para cada operación, con información que va desde las características generales, hasta las ecuaciones de diseño.
4. Establecimiento de las líneas de flujo, con líneas de entrada, intermedias y de salida.
5. Integración de las operaciones en cada uno de los equipos que integran el proceso. Se pueden manejar desde los tiempos de carga a las operaciones unitarias, el volumen o peso de cada una de las alimentaciones, hasta constantes de partición (para el caso del extractor) o características bioquímicas en el caso de biorreactores. El simulador puede proporcionar los perfiles de reacción para el caso de reacciones cinéticas por lote, proporcionando los datos en formato de Microsoft Excel.
6. Proceso de simulación. El SPD utiliza el bloc de notas de Windows para representar los resultados, los cuales pueden ser:
  - a. Reporte de flujos
  - b. Reporte de evaluación económica
  - c. Reporte de costos detallado
  - d. Reporte de análisis de productividad

- e. Reporte de impacto ambiental
  - f. Reporte de datos de entrada
7. Con esta información, se pueden hacer cambios a los datos de entrada al simulador para saber cual es la etapa limitante, el rendimiento del proceso, la productividad, el costo de cada uno de los equipos y la tasa de retorno, entre otros.

Una vez iniciado el SPD, se presenta una ventana con la opción de la elección del tipo de proceso; esto es, el modo de operación (lote, intermitente o continuo). Como se puede apreciar en la Figura 11, en esta ventana también se establece el tiempo anual de operación de la planta de procesos.

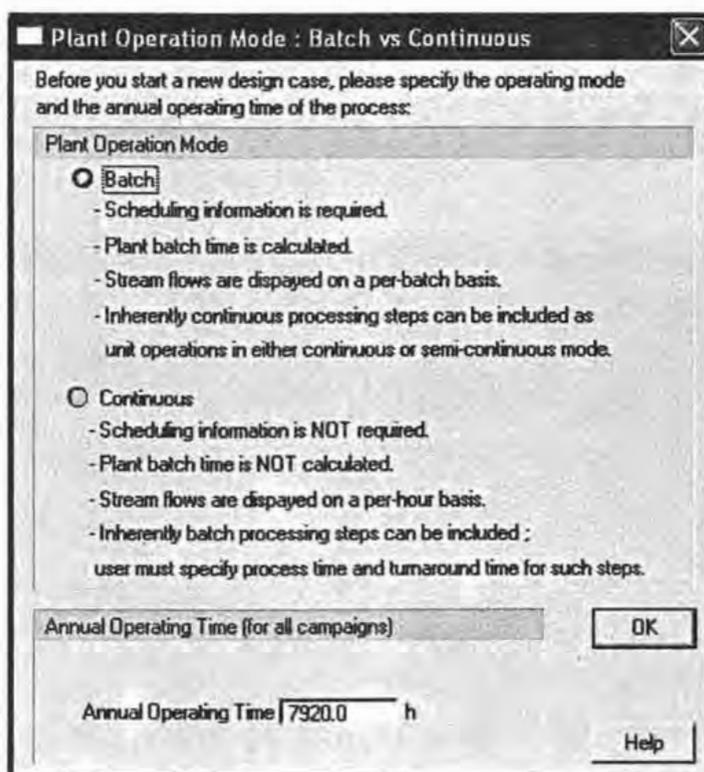


Figura 11. Ventana para escoger el modo de operación y el tiempo de operación anual de la planta.

### 3.4.1 Obtención de los datos de entrada al Simulador.

Dado que el programa no cuenta con las materias primas que se requieren para el proceso, éstas se tuvieron que incluir manualmente. Para esto se investigó la composición de la flor con un análisis bromatológico ó proximal.

#### 3.4.1.1 Determinación de la composición proximal de la flor de *T. erecta*.

Tabla 3. Estudio bromatológico de la flor fresca, la flor seca y la harina seca. (Naranjo, 2002)

Componente	% en flor fresca	% en flor seca	% en harina seca
Humedad	86.3	2.0	6.7**
Cenizas	0.9*	6.3	28.2
Grasas	1.2*	8.6	11.8
Fibra cruda	2.1*	15.4	39.8
Proteína	1.3*	9.2	9.1
Fibra dietética (por diferencia)	8.2	58.5	4.4

\* Datos calculados a partir del valor para flor seca.

\*\* Secado en estufa de vacío.

Tabla 4. Valores de la extracción de la oleorresina a partir de la harina seca. (Naranjo, 2002)

Material*	Promedio $\pm$ Desviación estándar** (g/kg)
Harina de flor	11.30 $\pm$ 0.17
Residuo industrial	0.37 $\pm$ 0.04

\* Porcentajes en base seca. Humedad = 7.9%  $\pm$  0.01 (por destilación con tolueno).

\*\* Resultados de tres determinaciones.

Tabla 5. Xantofilas totales en la oleoresina, el precipitado y el sobrenadante una vez concluida la extracción. (Naranjo, 2002)

	Oleoresina	Precipitado	Sobrenadante (absoluto)
Peso (g/kg)	0.51	0.15	0.36 (por diferencia)
Xantofilas totales (g/Kg)	72.3 ± 0.7	45	83 (por balance de materia)

Las xantofilas que se encuentran en la flor de cempasúchil incluyen una mezcla de ésteres de ácidos grasos.

Tabla 6. Composición porcentual de xantofilas en la harina de flor de cempasúchil. (Bioquimex, 2002)

Xantofilas	Composición (%)
Luteína	70.0 85.0
Zeaxantina	5.0 7.0
Cryptoxantina	0.5 1.0
cis-Luteína (o epóxidos)	7.0 – 24.5

Por comunicación personal de la empresa Bioquimex se sabe que de cada kilogramo de oleoresina se obtienen 70 g de xantofilas totales (Bioquimex, 2002). Con la información de las Tablas 4, 5 y 6 se estableció la composición proximal tomando en cuenta a la luteína y a los demás carotenoides (zeaxantina, Cryptoxantina y cis-luteína) agrupándolos en un solo grupo al cual se denominó xantofilas.

#### 3.4.1.2 Composición de la flor fresca y de la harina considerando a la luteína y demás carotenoides.

A partir de las siguientes operaciones se obtuvo el total de luteína y xantofilas en gramos, tanto en la flor fresca, como en la harina seca (Anexo 1).

$$\frac{110.5 \text{ g de harina}}{1000 \text{ kg flor fresca}} \times \frac{11.3 \text{ g oleoresina}}{1000 \text{ g harina}} \times \frac{0.07 \text{ g xantofilas}}{1 \text{ g de oleoresina}} \times \frac{0.8 \text{ g luteína}}{1 \text{ g xantofilas}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 0.7 \frac{\text{mg xantofilas}}{\text{g flor fresca}}$$

A partir de estos datos se realizaron los cálculos tomando en cuenta a la luteína aparte de las demás xantofilas presentes en la flor de cempasúchil (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997/b).

Se tomó como base 1 kg de cada una de las materias primas. La fibra cruda y la dietética se agruparon en un solo componente definido como fibra y los demás carotenoides se agruparon en un solo componente. Con estos datos se obtiene la Tabla 7, con la composición porcentual proximal definitiva que será la que se declare en el simulador.

Tabla 7. Cantidades de cada uno de los componentes de la flor tomando en cuenta los carotenoides presentes en la flor de cempasúchil.

Componente	% en la flor fresca	% en harina seca
Humedad	86.30	6.70
Cenizas	0.90	28.20
Fibra	10.30	44.20
Proteína	1.30	9.10
Grasas	1.11	11.01
Luteína	0.07	0.63
Xantofilas	0.02	0.16

### 3.4.2 Datos alimentados al simulador.

Se introdujo la información de los compuestos que se ocupan en cada una de las simulaciones. En el menú principal hay una opción que se llama "Base de datos", en la cual hay varias opciones de las cuales se ocupan "Componentes puros" y "Mezclas" (Figura 12).

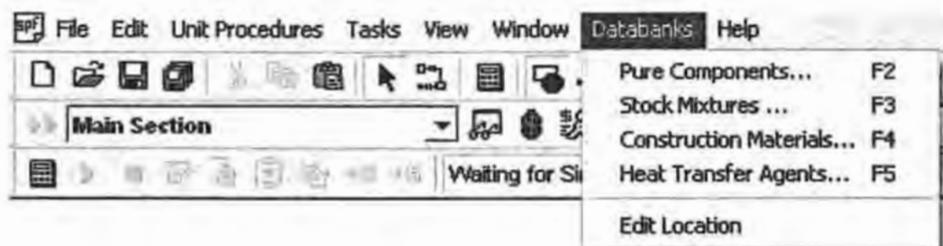


Figura 12. Menú principal del SPD donde aparece la base de datos y las diferentes opciones para introducir materiales nuevos que no están considerados en el programa.

Ya dentro de la base de datos se puede introducir una cantidad considerable de componentes, los cuales serán usados en cada una de las simulaciones. Los datos más importantes que el programa requiere son: Nombre, peso molecular, punto de fusión, punto de ebullición, precio de compra o de venta, si es tóxico, corrosivo y/o agresivo para el ambiente (Figura 13).

Una vez declarados los componentes, se prosigue con la declaración de las mezclas; en este caso las únicas mezclas que se utilizan para la alimentación en cada uno de los procesos simulados son la flor fresca de cempasúchil y la harina seca rica en xantofilas, que se elaboran a partir de los componentes introducidos anteriormente (Figura 15).

The screenshot shows a window titled "Component Databank" with a "Databank" dropdown menu set to "User". Below the menu is a table with 11 rows of data. The columns are "Name", "Local Name", and "Company ID". At the bottom of the window are buttons for "New...", "Delete", "Properties...", "OK", "Cancel", and "Help".

	Name	Local Name	Company ID
1	Ethyl Ether	Ethyl Ether	Ethyl Ether
2	Fiber	Fiber	Fiber
3	Hydrolytic E	Hydrolytic E	Hydrolytic E
4	Lipase	Lipase	Lipase
5	Lutein	Lutein	Lutein
6	Lutein DP	Lutein DP	Lutein DP
7	Lutein P	Lutein P	Lutein P
8	Na Palmitate	Na Palmitate	Na Palmitate
9	Palmitic Acid	Palmitic Acid	Palmitic Acid
10	Petroleum Ether	Petroleum Ether	Petroleum Ether
11	Tocopherol	Tocopherol	Tocopherol

Figura 13. Lista de compuestos agregados a la base de datos del SPD, para ser usados en cada simulación.

The screenshot shows a window titled "Stock Mixture Databank" with a "Databank" dropdown menu set to "User". Below the menu is a table with 2 rows of data. The columns are "Name", "Trade Name", and "Local Name". At the bottom of the window are buttons for "Properties...", "New...", "Delete", "OK", "Cancel", and "Help".

	Name	Trade Name	Local Name
1	C Flour	C Flour	C Flour
2	Fresh Flower	Fresh Flower	Fresh Flower

Figura 14. Lista de las mezclas agregadas a la base de datos del SPD, para ser usados en cada simulación.

El programa cuenta con un menú que contiene las operaciones unitarias más comunes en la industria alimentaria, biotecnológica y ambiental, como se puede observar en la Figura 15.

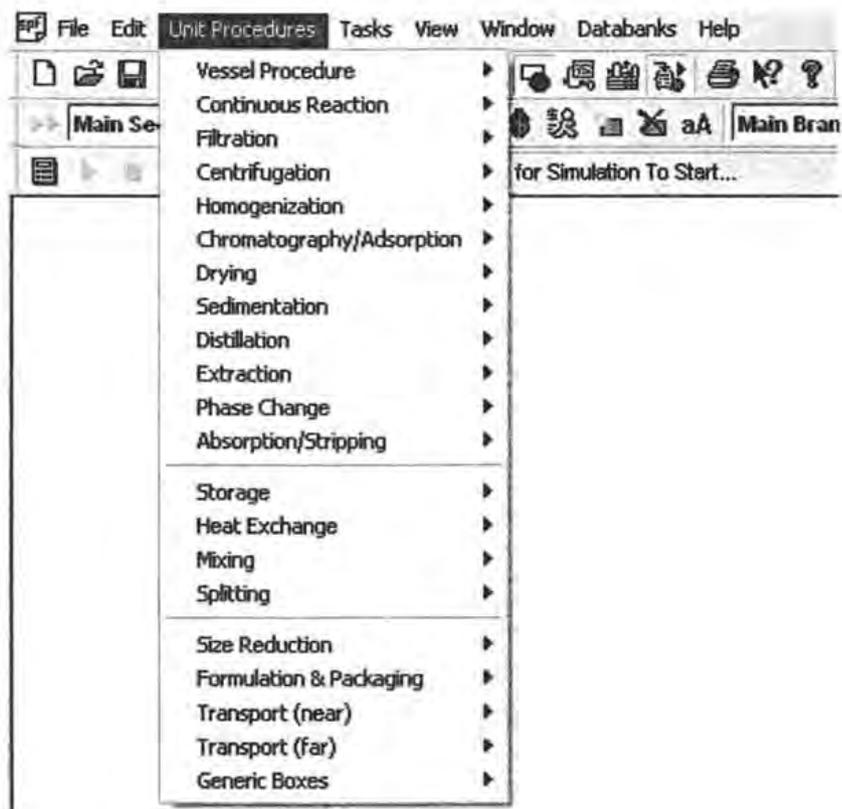


Figura 15. Menú de operaciones unitarias que incluye el SPD.

### **3.4.3 Procesos propuestos.**

Los procesos de obtención que se simularon son los siguientes:

1. Proceso tradicional empleado industrialmente.
2. Pre-tratamiento de la flor con enzimas hidrolíticas seguido de una extracción con solventes.
3. Extracción de harina sustituyendo la desesterificación con sosa por lipasas.
4. Extracción de flor auxiliada con dos pasos enzimáticos.

#### **3.4.3.1 Proceso tradicional empleado industrialmente.**

El proceso tradicional que involucra la etapa de pre-tratamiento de la flor, la cual abarca desde la cosecha de la flor hasta la obtención de la harina rica en colorantes y la etapa de extracción/saponificación.

##### **- Extracción.**

La harina es llevada por una banda donde se contacta con hexano, alimentado por bombas centrifugas y el flujo del solvente es a contracorriente en relación a la dirección de la banda transportadora de la harina rica en luteína (Figura 16). Después de la extracción, el hexano se retira por decantación.

##### **- Evaporación del solvente.**

El solvente rico en compuestos liposolubles es llevado a evaporadores al vacío para concentrar la oleorresina resultante. El solvente recuperado es almacenado para su reúso.

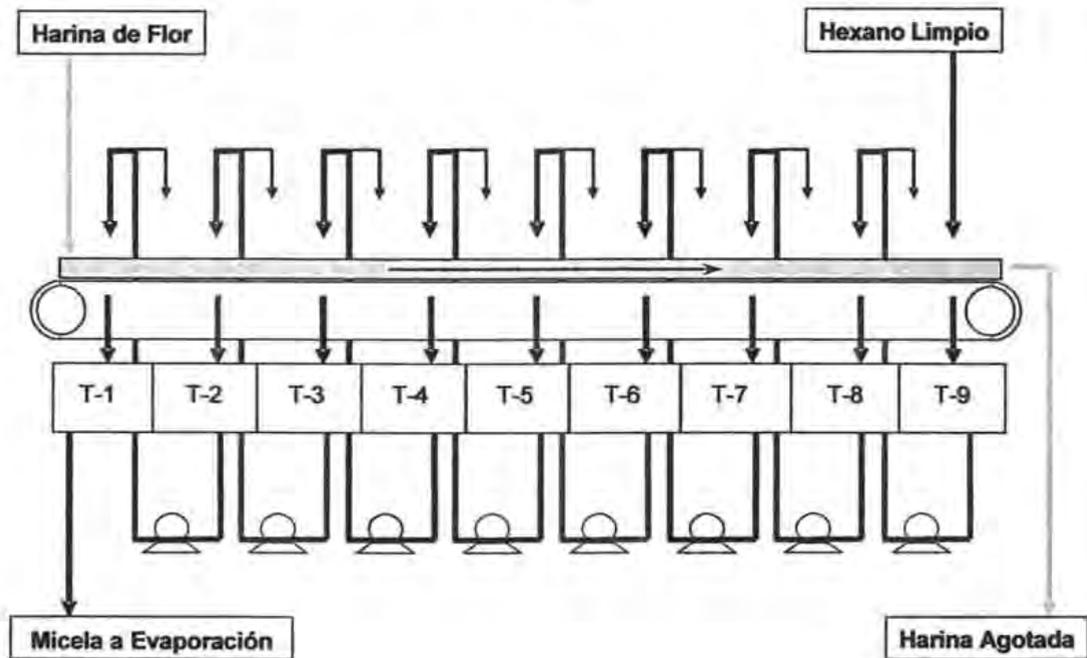


Figura 16. Esquema de extracción de los colorantes de la flor de cempasúchil (Bioquimex, 2002).

#### - Desesterificación Química.

La oleoresina obtenida es rica en luteína esterificada (ver Tabla 8). La composición depende de factores como la localización geográfica de los cultivos, las condiciones climáticas y las prácticas agronómicas (riego, fertilización, etc.). Para obtener la luteína libre desesterificada se utiliza una base (sosa o potasa) al 20-40% en exceso con respecto al índice de saponificación de la luteína (Bioquimex, 2002; Li *et al.*, 2002).

Tabla 8. Perfil típico de ácidos grasos que esterifican a las xantofilas presentes en la flor de cempasúchil (Bioquimex, 2002).

<b>Ácidos grasos saturados</b>	<b>Composición (%)</b>
Ácido palmítico (C16)	44.5
Ácido mirístico (C14)	23.0
Ácido araquidónico (C20)	12.0
Ácido esteárico (C18)	11.0
Ácido Láurico	2.0
<b>Ácidos grasos insaturados</b>	
Ácido linoléico (18:2)	3.0
Ácido oléico (18:1)	2.0
Ácido linoléico (18:3)	1.0
Otros ácidos grasos	1.5

Para obtener la presentación en forma sólida se utiliza una mínima cantidad de agua y un mezclador de alta potencia que produce una especie de jabón muy denso y de difícil mezclado, el cual se deja enfriar (la desesterificación es una saponificación en realidad y es una reacción exotérmica), se tritura y mezcla con un vehículo. La concentración del producto terminado está en función de la cantidad de aditivos agregados, que comúnmente es tocoferol, el cual funciona como antioxidante.

Para el caso de la presentación acuosa, se usa una mayor cantidad de agua en la saponificación. Al término de la reacción se añade más agua hasta alcanzar la concentración deseada. Por lo general esta concentración es de aproximadamente 1.5% de carotenoides. Finalmente, se aprovecha la capacidad emulsificante de los jabones producidos y de los triacilglicéridos presentes también en la oleorresina para hacer una suspensión estable de los carotenoides (Bioquimex, 2002).

### 3.4.3.2 Pre-tratamiento de flor con enzimas hidrolíticas seguido de una extracción con solventes.

Una alternativa de proceso es emplear directamente la flor fresca y así evitar el paso de preparación de la harina. Para esto se puede emplear un pre-tratamiento enzimático. Esta idea surge de los altos costos energéticos y la oxidación que ocurre durante el secado en el proceso tradicional. Además se evita la generación de un lixiviado con alta demanda bioquímica de oxígeno y alto potencial contaminante. Dichas descargas usualmente se vierten al alcantarillado sin ningún tratamiento previo. Las descargas rebasan por mucho los límites máximos permisibles por la Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 para contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales, según se observa en la Tabla 9.

Tabla 9. Caracterización de las aguas residuales del ensilado y del prensado de la flor de cempasúchil y los valores máximos permisibles por la norma oficial mexicana (SEMARNAT, 2004).

Parámetros (mg/L)	Ensilado	Prensado	NOM-001-SEMARNAT-1996
Temperatura (°C)	---	---	40
Aceites y grasas	486	470	25
Sólidos sedimentables (mL/L)	---	600	2
Sólidos suspendidos totales	3 150	24 000	60
Demanda Bioquímica de Oxígeno	56 900	40 170	60
Nitrógeno total	590	1 160	25
Fosfato total	1 580	1 500	10

El otro inconveniente que tiene el sistema tradicional son los tiempos muy largos de residencia en el ensilado, llegando a durar hasta tres semanas, lo que lo convierte en un "cuello de botella" del proceso. A partir de estos dos puntos críticos en el proceso surge la justificación de emplear enzimas macerantes sobre la flor fresca. Las más utilizadas son pectinasas, celulasas, hemicelulasas y

proteasas, con la función de romper la pared celular de la flor y dejar expuestos a los colorantes para su extracción con hexano (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997/b; Bárzana *et al.*, 2002).

En el caso de la maceración enzimática, se supuso que la extracción de luteína es proporcional a la velocidad de reacción de hidrólisis de celulosa, ya que al haber una mayor degradación de las paredes celulolíticas, el colorante se halla más expuesto a la acción del solvente orgánico.

Otra suposición fué que el producto de la hidrólisis de la celulosa es glucosa, esto es dando por hecho que la hidrólisis no es completa y que no hay sub-productos. La razón de esta suposición fue el contar con datos precisos para el simulador, aún sabiendo que la acción de la celulasa resulta en una mezcla compleja de oligómeros que es imposible de tipificar en su composición (Figura 17).

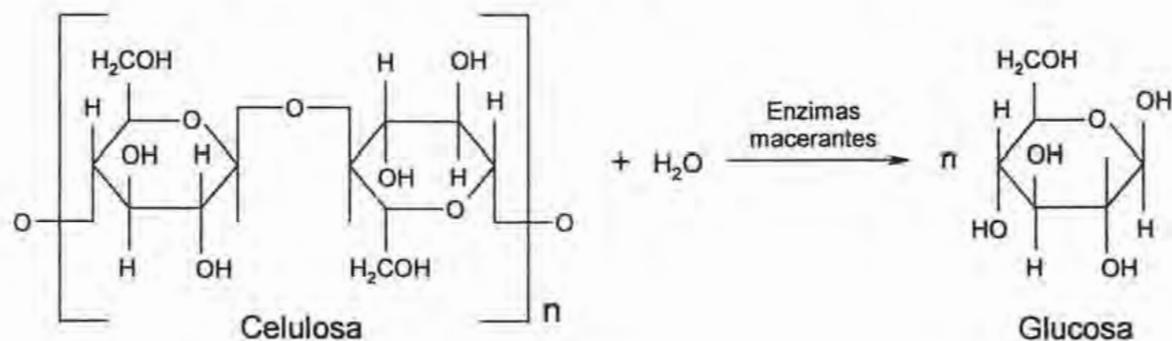


Figura 17. Reacción de hidrólisis de celulosa.

Después de permanecer en el reactor enzimático, la flor macerada pasa al extractor y el proceso continúa como en el caso tradicional.

### 3.4.3.3 Extracción de harina sustituyendo la desesterificación con sosa por lipasas.

El proceso de desesterificación química es el proceso más comprometido de la extracción de colorantes, ya que la FDA considera como agentes tóxicos a la sosa y la potasa prohibiendo su uso en procesos para alimentos o aditivos grado alimenticio. Por ello se han diseñado algunas alternativas que están en etapa de desarrollo.

Una alternativa elegante para evitar el uso de químicos de uso restringido puede ser el empleo de un proceso enzimático. En la literatura, la hidrólisis de ésteres de carotenoides con enzimas es limitada. Se han realizado investigaciones sobre ésteres de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -cryptoxantina en leche materna y suero y se han hidrolizado parcialmente ésteres de capsantina por una lipasa de *Candida rugosa* (Zorn *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos años el empleo de enzimas en medios no acuosos, para catalizar reacciones específicas, ha tomado gran relevancia. El empleo de lipasas de diferentes fuentes ha sido motivo de estudio por su gran aplicación en diferentes campos, sobre todo cuando se requiere una gran especificidad y estereoselectividad, para obtener productos de interés comercial.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos dando glicerol y ácidos grasos. Son de gran interés por las muchas ventajas que tienen sobre la catálisis convencional, utilizándose muy comúnmente en reacciones de hidrólisis de ésteres y últimamente han sido empleadas en reacciones de síntesis en medios orgánicos (Kuo *et al.*, 2002).

En la desesterificación con lipasa de la luteína, se intercambian los ácidos grasos por radicales hidroxilo (-OH) presentes en el agua del medio. Dicha reacción se lleva en dos pasos secuenciales que producen luteína mono-esterificada como

intermediaria, seguido de la formación de luteína libre. Se liberan también dos ácidos grasos de cadena larga.

El biocatalizador debe estar inmovilizado dentro del reactor, permitiendo que la enzima se pueda utilizar más de una vez. Una vez que dicha actividad disminuya considerablemente, ésta se puede reemplazar por un nuevo lote y continuar con el proceso.

Entre los científicos especializados en el tema no hay un común acuerdo en la biodisponibilidad de la luteína, ya que mientras algunos aseguran que la luteína libre es mejor absorbida en el tracto digestivo, otros aseveran que es la luteína esterificada quien tiene mejor oportunidad de llegar al torrente sanguíneo (Figura 18).

Este proceso todavía en etapa de estudio a nivel de laboratorio, no ha sido optimizado. Los tiempos de reacción con lipasas de *Candida antarctica* o *Mucor miehei*, para alcanzar una conversión aceptable son de 70 horas aproximadamente (que no fue el objetivo de este trabajo), por lo que para que llegue a ser rentable industrialmente será necesario modificar algunas variables para reducir el tiempo de reacción, principalmente.



Figura 18. Ruta que sigue la luteína en el cuerpo humano, desde la ingesta, hasta su ubicación final en el ojo (Landrum *et al.*, 1997).

El reactor enzimático seleccionado fue del tipo BR (Batch Reactor), ya que el programa no cuenta con reactores continuos empacados. El medio de reacción que se utilizó fue hexano.

El proceso de desesterificación enzimática, conlleva dos pasos, pero en este trabajo sólo se considero una reacción global, tal como se muestra en la Figura 19.

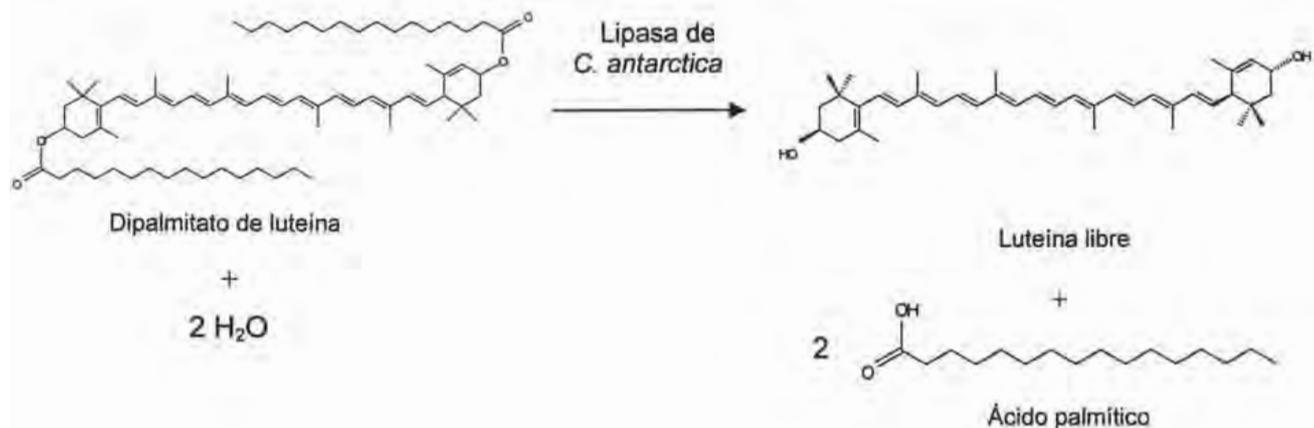


Figura 19. Reacción global de la hidrólisis del dipalmitato de luteína.

Después del reactor enzimático, se propuso colocar un filtro para retener la enzima inmovilizada que está en el reactor, esto con el fin de que la enzima no salga por arrastre del proceso.

Resulta de interés en laboratorios dedicados a la síntesis enzimática de compuestos con valor agregado, por lo que paralelo a este trabajo se estandarizó un método para medir actividad enzimática a cualquier lipasa empleando cromatografía de gases (ver Anexo 3), ya que es necesario contar con un método estándar, rápido y confiable para medir la actividad enzimática a las lipasas con actividad hidrolítica de triacilglicéridos.

#### **3.4.3.4 Extracción de flor auxiliada con dos pasos enzimáticos..**

En este caso se buscó utilizar ambos procesos enzimáticos (maceración y desesterificación) química, mediante el empleo de enzimas macerantes en reactores empacados en medio acuoso seguido de la extracción en medio orgánico y en presencia de lipasas inmovilizadas.

Este tipo de procesos involucra dos sistemas diferentes ya que el primer reactor requiere una cantidad significativa de agua, mientras que en el otro la cantidad es mínima, mezclada con hexano como medio mayoritario. Con la incorporación de los dos pasos enzimáticos, se busca minimizar tiempos y ocupar materiales menos agresivos y menos contaminantes generados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Balance de materiales y condiciones de operación de cada uno de los procesos obtenidos por el SPD.

Por conveniencia, cada proceso cuenta con un número de identificación.

4.1.1 P 1. Proceso tradicional empleado industrialmente.

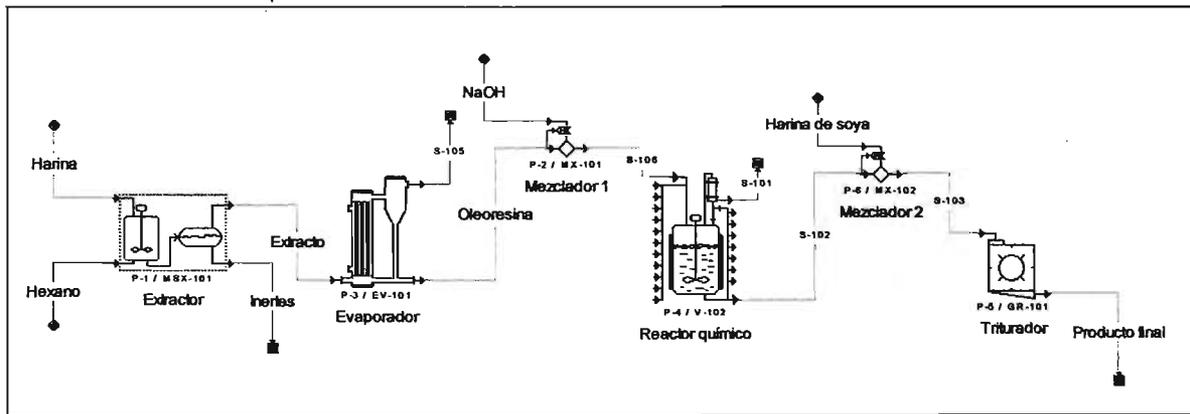
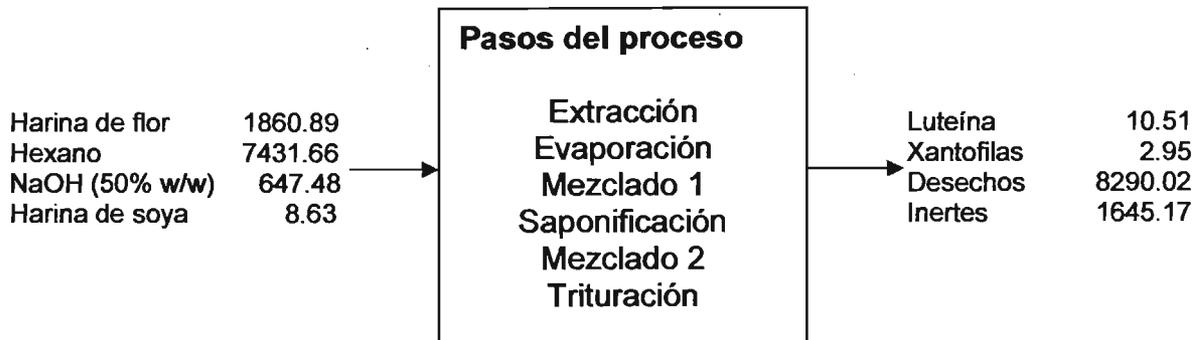


Figura 20. Diagrama del proceso 1 utilizando el SPD.

4.1.1.1 Materiales.



$\Sigma \text{ entrada} = \Sigma \text{ salida} = 9,948.66 \text{ kg/lote}$

Figura 21. Balance de materiales general para el proceso 1 (kg/10 horas).

Material inerte se refiere a aquel que sale del extractor y que no es soluble en hexano, mientras que material de desecho incluye al material hidrofóbico.

En la Tabla 10 se presentan los datos de entrada para las materias primas utilizadas este proceso.

Tabla 10. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 1.

<b>Materias Primas</b>	<b>kg/lote</b>
Harina de flor de cempasúchil	1861
Hexano	7432
Solución de NaOH 50% w/w	647
Harina de soya	9

Estos valores de entrada se seleccionaron a partir de de la proyección que se presentó en el capítulo anterior.

#### 4.1.1.2 Condiciones de operación.

##### 4.1.1.2.1 Extractor.

El primer equipo que se utiliza en este proceso es el extractor. La Tabla 11 muestra los coeficientes de partición de los solutos en hexano, definido como

$$\text{Coeficiente de partición (K)} = \frac{C_s}{C_g}$$

Donde  $C_s$  es la concentración del analito en la fase sólida hidrofílica y  $C_g$  es la concentración del analito en la fase orgánica.

Tabla 11. Coeficientes de partición de los compuestos solubles en hexano (Cooper *et al.*, 1997).

Compuesto	Kp
Diéster de luteína	14.8
Xantofilas	17.6
Grasas	7.7

Se considera que estos compuestos se encuentran en medio acuoso por la naturaleza hidrofílica de la harina de flor, por lo que se asevera que la fase ligera es el hexano y la fase más densa es el sólido. Para la hidrólisis es necesario incluir la solubilidad del hexano en agua y viceversa; dichos valores se encuentran en la Tabla 12.

La relación de harina/solvente que se ocupó fue de 1:4, este dato se obtuvo de la literatura (Domínguez *et al.*, 1995), donde se menciona que para una mejor extracción, la relación puede ser 1:3 ó 1:4, sin embargo se eligió la segunda para este trabajos, ya que es la que más se utiliza pues presenta mejores rendimientos de reacción (Bárzana *et al.*, 2002)

Tabla 12. Solubilidad de los solventes que forman el sistema bifásico agua-hexano (Reddy *et al.*, 2003).

Solubilidad	g/mL
Agua en hexano	0.066
Hexano en agua	0.010

#### **4.1.1.2.2 Evaporador.**

El evaporador requiere que se declare qué compuesto o compuestos se van a evaporar y en qué porcentaje. En este caso, el compuesto a evaporar fue el Hexano al 100%, y el agente de calentamiento usado fue vapor seco.

La temperatura del vapor a la entrada del evaporador es de 140 °C, mientras que la temperatura de la solución con luteína en el evaporador es de 40 °C puesto que a esta temperatura el compuesto de interés no sufre daño por calor.

#### **4.1.1.2.3 Reactor químico.**

El reactor químico tiene un volumen de operación al 90%, pero por convención se prefirió usar el reactor a un 80% de su capacidad total. La reacción que se lleva a cabo en este equipo se denominó "Saponificación".

El tipo de reacción que se eligió para esta reacción fue de tipo estequiométrica, con un tiempo de reacción de 2 horas, a una temperatura de operación de 60 °C, y una conversión máxima del 91% (Li *et al.*, 2002). Se eligió una reacción estequiométrica debido a que no se pretendía monitorear el avance de reacción, pues está establecido que a 60 °C, durante dos horas, se alcanza una conversión máxima del 91%.

#### 4.1.1.3 Simulaciones para el proceso P 1.

##### 4.1.1.3.1 Tiempo de proceso.

El simulador arroja el tiempo total que dura un lote, así como el tiempo de cada uno de los equipos que conforman el proceso (Tabla 13).

Tabla 13. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 1.

Equipo	Tiempo (h)
Extractor	4.00
Evaporador	1.00
Mezclador 1	0.50
Reactor Químico	3.67
Mezclador 2	0.50
Triturador	2.00
<b>Total</b>	<b>10.00</b>

El tiempo de proceso es de 7920 horas/año, considerando 1000 lotes al año. La Figura 22 muestra los tiempos que entrega el SPD en el ambiente Windows y la Figura 23 muestra tres lotes tal como se llevarían a cabo en un planta industrial, se aprecia que no es necesario esperar a que termine un lote completo para comenzar el siguiente, si no que mientras un lote se encuentra en el reactor químico, el siguiente puede iniciar en el extractor.

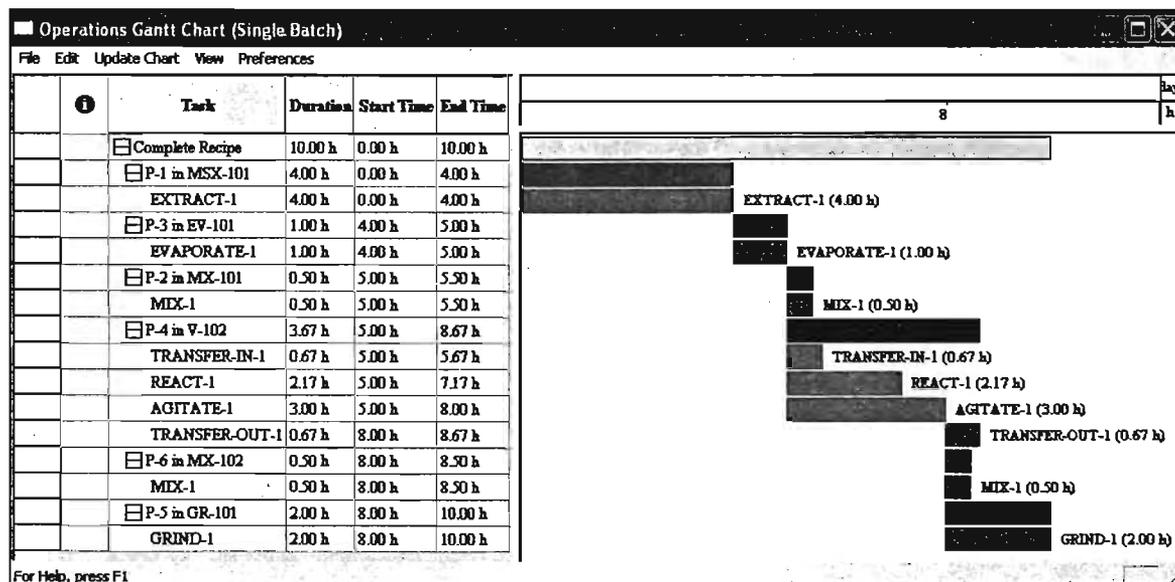


Figura 22. Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso P1, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.

#### 4.1.1.3.2 Diseño de los equipos.

El SPD, permite que el usuario decida si es el mismo programa quien dimensione cada uno de los equipos del proceso o si se prefiere que lo haga el usuario. En este caso se prefirió que el simulador hiciera el Dimensionamiento. La Tabla 14 muestra los datos obtenidos por el simulador.

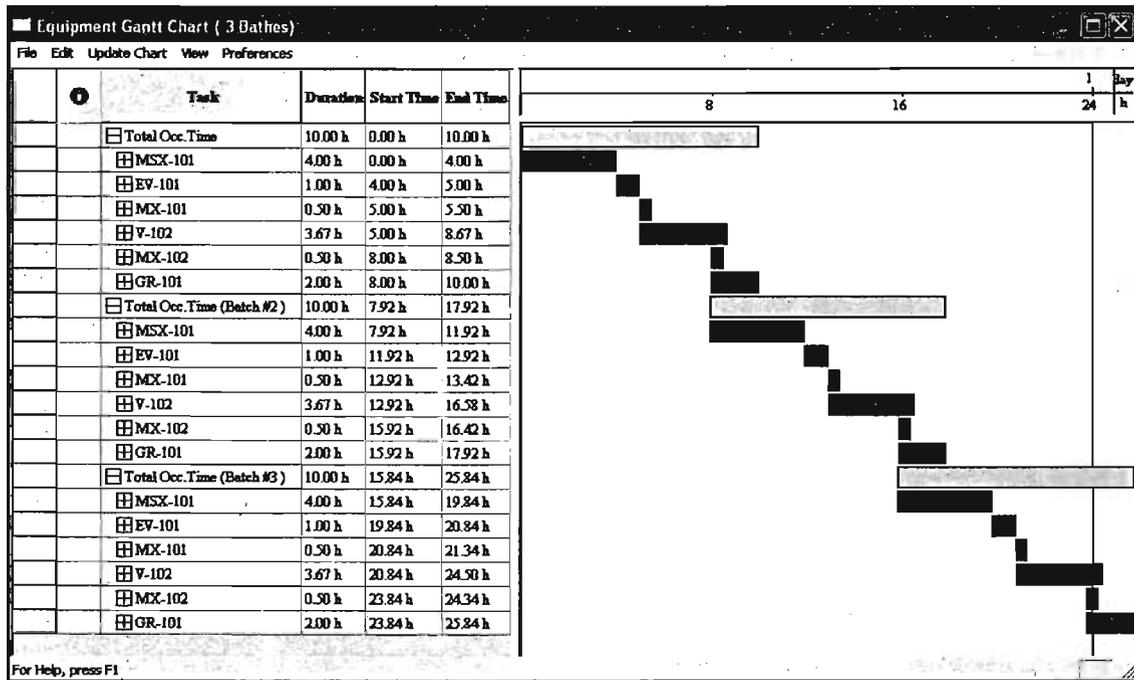


Figura 23. Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 1.

Tabla 14. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 1.

Equipo	Característica	Valor
Extractor	Rendimiento nominal	3.50 m <sup>3</sup> /h
	Volumen del mezclador	0.108 m <sup>3</sup>
	Volumen del estabilizador	0.540 m <sup>3</sup>
Evaporador	Número de efectos	1
	Área por efecto	17.995 m <sup>2</sup>
Mezclador 1	Rendimiento nominal	1750.9 kg/h
Reactor Químico	Volumen	941.81 L
	Diámetro	0.789 m
	Altura	1.957 m
Mezclador 2	Rendimiento nominal	871.94 kg/h
Triturador	Rendimiento nominal	594.63 kg/h

#### 4.1.1.3.3 Salida del proceso.

Una vez que se lleva a cabo el balance de materia, se puede revisar el flujo de salida del proceso, lo que facilita la simulación, ya que tan solo con seleccionar la línea de salida uno puede ver el contenido de ésta (ver Tabla 15). Esta información se comparará con los resultados de rendimiento proporcionados por Bioquimex, vía comunicación personal.

Tabla 15. Composición de luteína y xantofilas (xantofilas totales) en la salida para el proceso 1 y comparación con lo reportado por Bioquimex.

Compuesto	Velocidad de flujo (kg/lote)	Composición másica (%)
Luteína	10.57	1.21
Xantofilas	2.95	0.34
<b>Total</b>	12.52	1.55
Bioquimex		1.50

Como se puede ver en la Tabla 15, el resultado obtenido por el simulador es muy parecido al proporcionado por Bioquimex, por lo que se considera el resultado del SPD como válido. El término xantofilas abarca las xantofilas que están en menor proporción en la flor de cempasúchil.

4.1.2 P 2. Pre-tratamiento de flor con enzimas hidrolíticas seguido de una extracción con solventes.

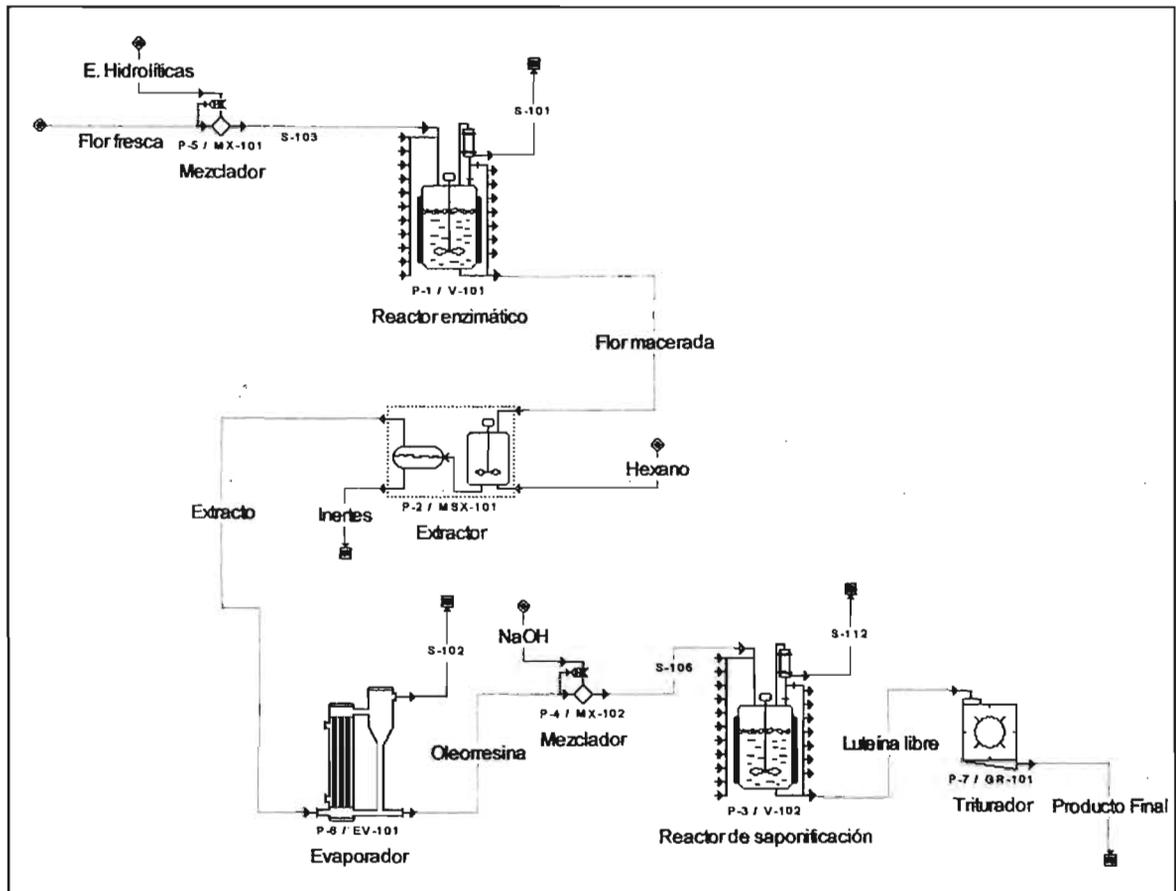
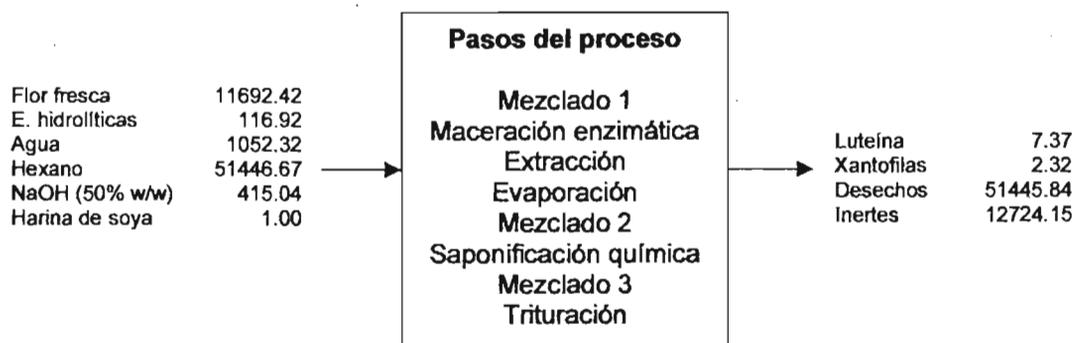


Figura 24. Diagrama del proceso 2 utilizando el SPD.

4.1.2.1 Materiales.



$$\Sigma \text{ entrada} = \Sigma \text{ salida} = 64,724.38 \text{ kg/lote}$$

Figura 25. Balance de materiales general para el proceso 2 (kg/11.8 horas)

En este proceso la materia prima principal es la flor fresca de cempasúchil, sin haber sufrido algún tratamiento previo. Con base en la producción establecida en el capítulo anterior, en la Tabla 16 se muestran las cantidades de las materias primas alimentadas al proceso.

Tabla 16. Kilogramos de materia prima alimentados para el proceso 2.

<b>Materias Primas</b>	<b>kg/lote</b>
Flor fresca de cempasúchil	11692
Enzimas hidrolíticas	117
Agua	1052
Hexano	51447
Solución de NaOH 50% w/w	414
Harina de soya	5

Las enzimas que se utilizaron son Viscozyme y Neutralse de Novo-Nordisk (Dinamarca). Viscozyme es una preparación que contiene varias actividades enzimáticas, principalmente pectinasas, celulasas y hemicelulasas, mientras que Neutralse es una enzima proteolítica de origen bacteriano (Bárzana *et al.*, 2002).

Las condiciones de operación para cada uno de los equipos involucrados son los mismos que para el proceso anterior, con excepción del reactor enzimático.

#### **4.1.2.2 Condiciones de operación.**

Antes de hacer el balance de masa del proceso, es necesario introducir las condiciones en las cuales cada uno de los equipos va a operar. Si este paso se omite, el balance no se lleva a cabo, ocasionándose un conflicto en el simulador.

#### 4.1.2.2.1 Reactor enzimático 1.

La única diferencia de este proceso respecto al anterior es el reactor enzimático en el cual se pone en contacto la flor junto con enzimas hidrolíticas. Se pretende con esto romper el material celulolítico, componente principal de la flor de cempasúchil, para que queden expuestas las xantofilas y los compuestos liposolubles y así el hexano pueda ejercer su acción de disolvente más fácilmente.

Al iniciar la reacción de hidrólisis enzimática, la flor se mezcla con una solución acuosa en una relación de 1:10, la cual tiene disuelta enzimas hidrolíticas al 1% (v/w ó w/w, dependiendo de la presentación del biocatalizador) respecto a los kilogramos de flor alimentados (Bárzana *et al.*, 2002).

El tipo de reacción que se eligió fue controlada por cinética, por lote y el valor de la  $k_{cat}$  se obtuvo de un trabajo anterior (Bárzana *et al.*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, al agregar una mezcla de enzimas donde cada una realiza un corte específico, el producto teórico final serán moléculas equivalentes a glucosa. Se estableció que como mínimo iban a producir dos moléculas de glucosa a partir de celulosa. No se consideraron otros polímeros que se encuentran en los tejidos vegetales. En la Tabla 17 se muestran los valores que se introdujeron al simulador.

Tabla 17. Condiciones de reacción para la hidrólisis de la celulosa.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Volumen de reacción	80%
Reacción	Hidrólisis enzimática
$k_{cat}$ (Constante de velocidad)	$5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
Tiempo de reacción	1 hora
Temperatura de operación	25 °C

Los datos introducidos a los demás equipos involucrados en el proceso, son los mismos que en el proceso anterior.

### 4.1.2.3 Simulaciones para el proceso P 2.

#### 4.1.2.3.1 Reactor enzimático 1.

El simulador arrojó el perfil de reacción que se muestra en la Figura 26 para celulosa y glucosa como reactivo y producto respectivamente.

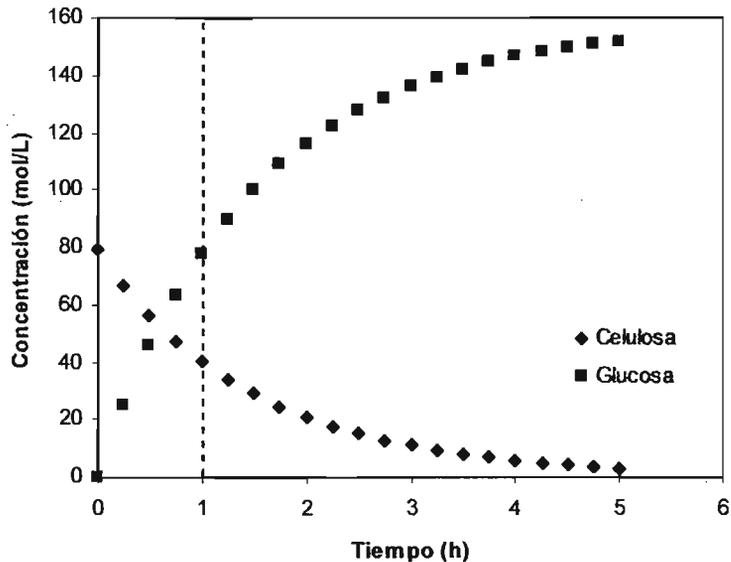


Figura 26. Cinética de reacción de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Como se puede apreciar en esta figura, el comportamiento que sigue esta reacción es hiperbólico. Se tomó un tiempo de reacción 1 hora, que es el tiempo que se recomienda para la maceración de materiales que contienen sustancias liposolubles, los cuales se extraen con solventes orgánicos. Sin bien es cierto que la maceración favorece la extracción, esta relación no es directamente proporcional y sólo es válida para tiempos cortos. (Rosenthal *et al.*, 1996; Bárzana *et al.*, 2002)

Se llevaron a cabo diferentes simulaciones variando la concentración inicial de la enzima para observar su efecto en la cinética de hidrólisis de la celulosa, lo que se puede apreciar en la Figura 27.

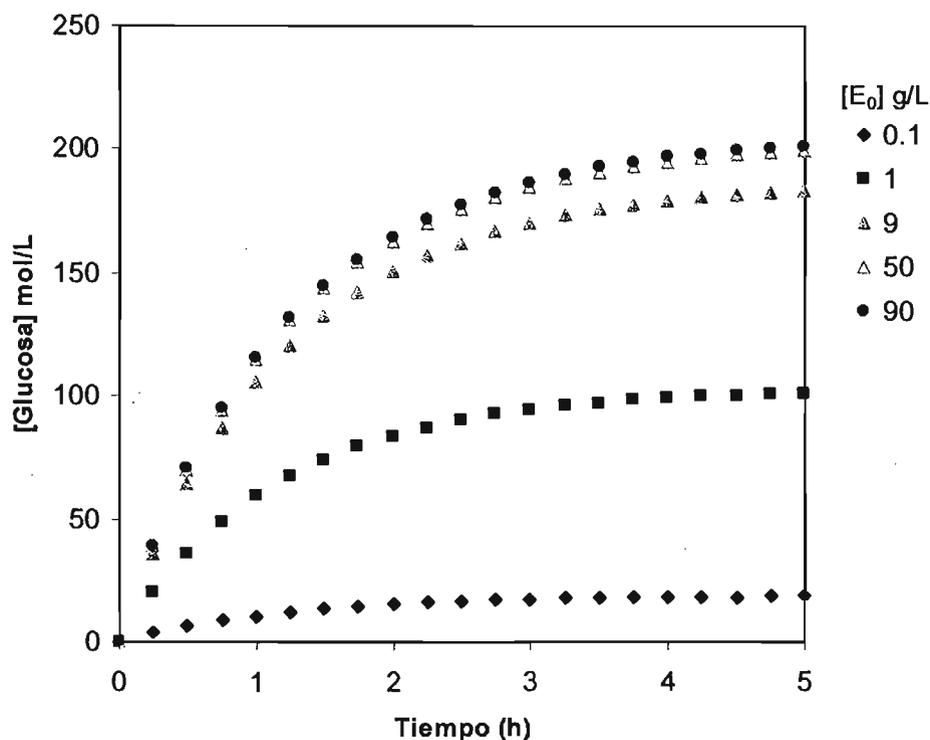


Figura 27. Gráfico que muestra la aparición de glucosa con respecto al tiempo a diferentes concentraciones iniciales de enzima.

De cada simulación se obtuvo la velocidad inicial durante los primeros 30 minutos, para corroborar el comportamiento de la reacción de hidrólisis de celulosa con respecto al tiempo. Esto se puede ver en la Figura 28, dando como resultado un comportamiento hiperbólico.

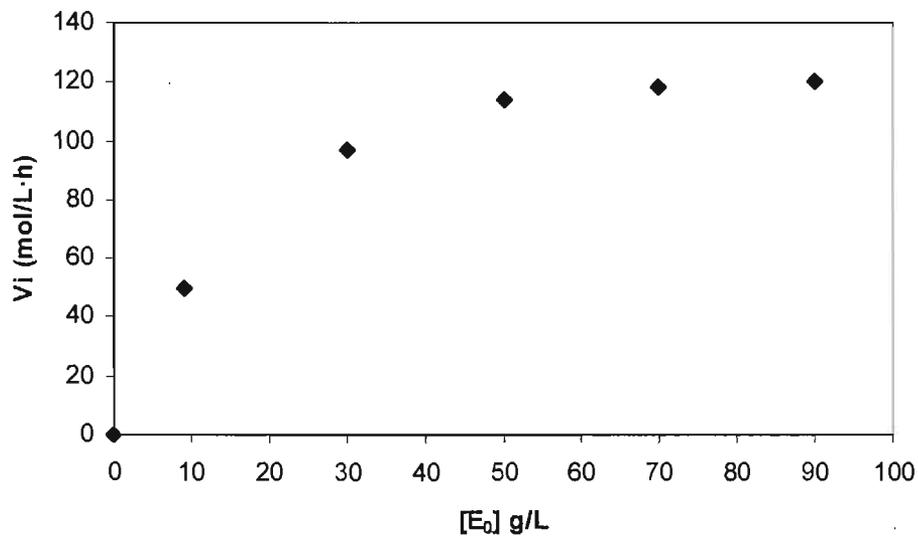


Figura 28. Gráfico que muestra la relación hiperbólica de la velocidad inicial con respecto a la concentración de enzima.

Cabe señalar que los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ , se obtuvieron de datos experimentales generados en el laboratorio y se introdujeron al simulador para poder representar la reacción de maceración enzimática. Para esta reacción no se varió la concentración del sustrato, solo la concentración de la enzima.

Se omiten los demás equipos, ya que son los mismos que los que se ocuparon en el proceso tradicional.

#### 4.1.2.3.2 Tiempo de proceso.

El simulador arroja el tiempo total que dura un lote, así como el tiempo de cada uno de los equipos que conforman el proceso (Tabla 18).

Tabla 18. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 2.

<b>Equipo</b>	<b>Tiempo (h)</b>
Mezclador 1	0.50
Reactor enzimático	1.83
Extractor	4.00
Evaporador	1.00
Mezclador 2	0.50
Reactor químico	3.67
Mezclador 3	0.50
Triturador	2.00
<b>Total</b>	<b>11.83</b>

El tiempo de proceso es de 7920 horas/año, por lo que se consideran 1978 lotes. La Figura 29 muestra los tiempos como los proporciona el SPD en el ambiente Windows y la Figura 30 muestra tres lotes tal como se llevarían a cabo en la planta industrial.

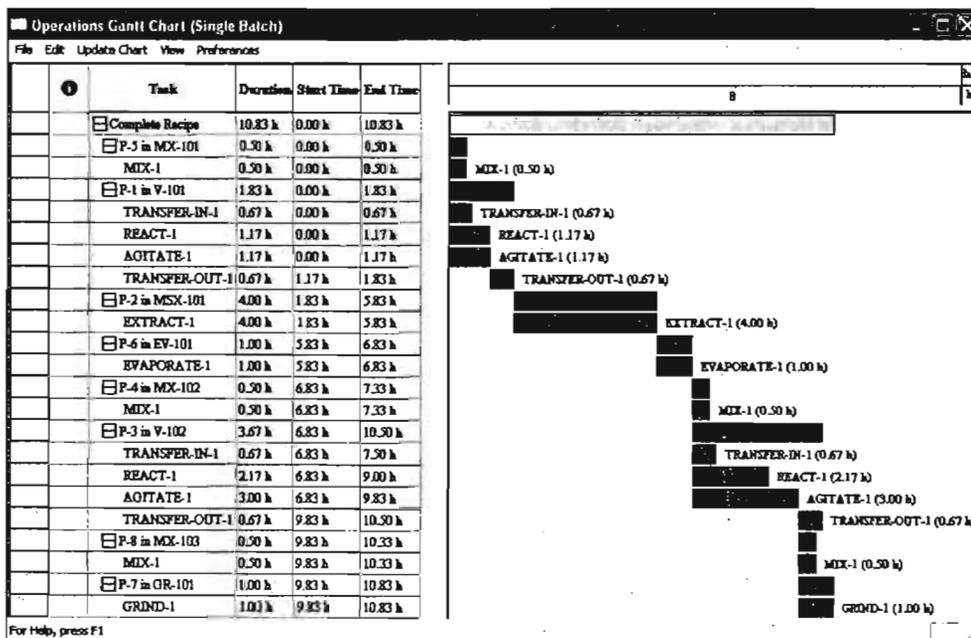


Figura 29. Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso 2, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.

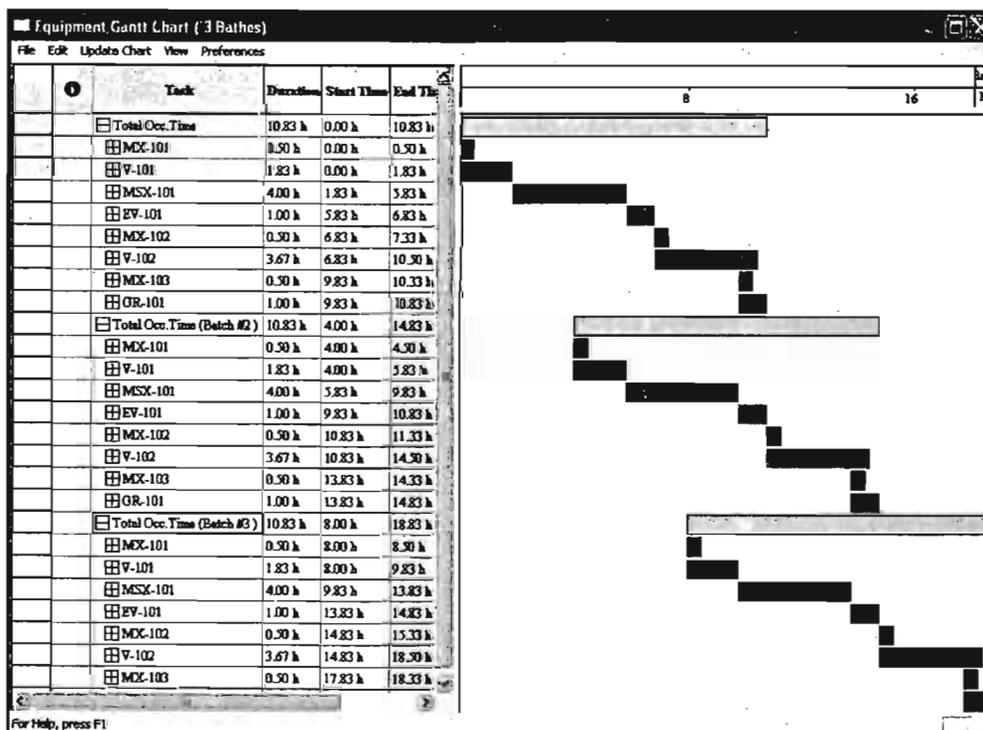


Figura 30. Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 2.

## 4.1.2.3.3 Diseño de los equipos.

Nuevamente para este caso se prefirió que el simulador hiciera el Dimensionamiento; la Tabla 19 muestra los datos obtenidos del simulador.

Tabla 19. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 2I.

Equipo	Característica	Valor
Mezclador 1	Rendimiento nominal	56951.73 kg/h
Reactor Enzimático	Volumen	17830.98 L
	Diámetro	2.086 m
	Altura	5.216 m
Extractor	Rendimiento nominal	23.20 m <sup>3</sup> /h
	Volumen del mezclador	11.600 m <sup>3</sup>
	Volumen del estabilizador	23.199 m <sup>3</sup>
Evaporador	Número de efectos	1
	Área por efecto	125.358 m <sup>2</sup>
Mezclador 2	Rendimiento nominal	1222.18 kg/h
Reactor Químico	Volumen	593.68 L
	Diámetro	1.678 m
	Altura	0.671 m
Mezclador 3	Rendimiento nominal	1117.58 kg/h
Triturador	Rendimiento nominal	558.79 kg/h

#### 4.1.2.3.4 Salida del proceso.

Una vez que se llevó a cabo el balance de materia, se puede revisar el flujo de salida del proceso. La Tabla 20 muestra los flujos de salida de luteína y xantofilas. Estas se compararán con los resultados de la concentración de xantofilas totales proporcionados por Bioquimex, vía comunicación personal.

Tabla 20. Composición de luteína y xantofilas (xantofilas totales) en la salida para el proceso 2 y comparación con lo reportado por Bioquimex.

Compuesto	Velocidad de flujo (kg/lote)	Composición másica (%)
Luteína	7.38	1.32
Xantofilas	2.32	0.41
<b>Total</b>	<b>9.70</b>	<b>1.73</b>
Bioquimex		1.50

Como se puede ver en la Tabla 20, el resultado para xantofilas es mayor al proporcionado por Bioquimex, es decir, que hubo una mayor producción de luteína, en comparación al proceso tradicional. Posteriormente en el análisis de resultados, se hará un estudio mas profundo de éstos.

### 4.1.3 P 3. Extracción de harina sustituyendo la desesterificación con sosa por lipasas.

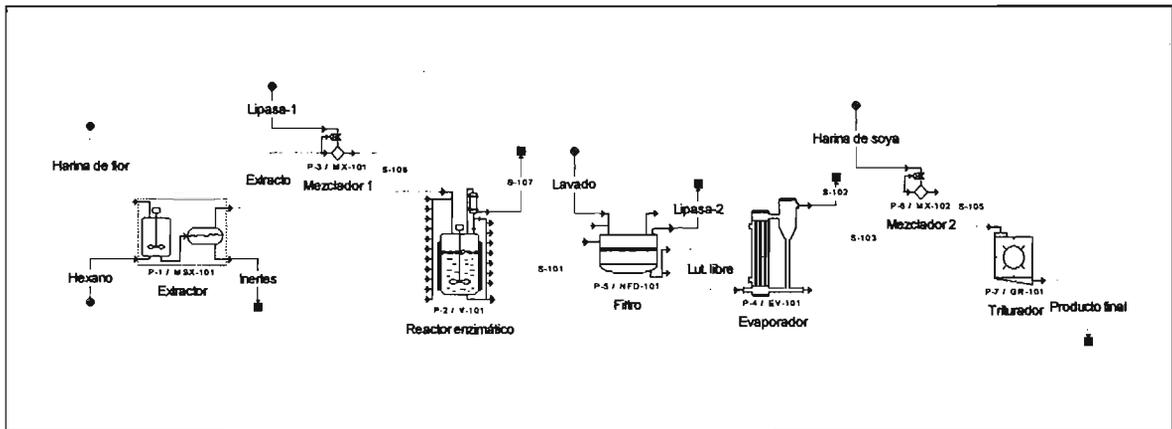
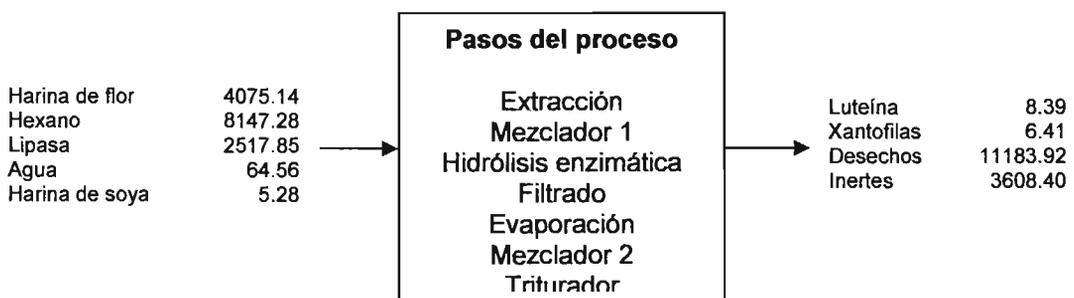


Figura 31. Diagrama del proceso 3 utilizando el SPD.

#### 4.1.3.1 Materiales.



$$\Sigma \text{ entrada} = \Sigma \text{ salida} = 14,807.12 \text{ kg/lote}$$

Figura 32. Balance de materiales general para el proceso 3 (kg/30.7 horas).

En este proceso (Figura 31), se utiliza harina de flor, donde una vez que ha pasado por el extractor, es seguido de la hidrólisis enzimática de la luteína presente en el extracto (Figura 32). En la Tabla 21 se muestran las materias primas empleadas en este proceso y la cantidad en kilogramos de cada una por lote.

Tabla 21. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 3.

<b>Materias Primas</b>	<b>kg/lote</b>
Harina de flor de cempasúchil	4072.1
Hexano	8147.2
Lipasa (Novozym 435) *	2517.8
Agua	64.5
Harina de soya	5.2

(\*) La lipasa se encuentra empacada en el reactor. Se consideró como materia prima, pues para que el primer lote inicie es necesario tomar en cuenta la cantidad de enzima en el reactor. Cabe hacer la aclaración que dicha cantidad de enzima se puede usar en más de un lote.

#### **4.1.3.2 Condiciones de operación.**

En este caso se omiten las condiciones del extractor y del evaporador, pues tienen las mismas características de operación que en el proceso tradicional.

##### **4.1.3.2.1 Reactor enzimático 2.**

Como se mencionó anteriormente, el reactor se encuentra empacado con lipasa. En este caso se ocupó una lipasa comercial de Novozyme Inc. (Dinamarca) llamada Novozym 435, del cual se tomaron los datos cinéticos experimentales generados en el laboratorio para la hidrólisis de los diésteres de luteína.

Ya que el simulador no cuenta con un reactor empacado, se mezcló el flujo principal con lipasa, y la mezcla resultante es vertida en el reactor enzimático 2,

para que se lleve a cabo la reacción a 60 °C. A la salida del reactor el flujo pasa por un filtro donde queda retenida la enzima.

Se eligió un modelo de reacción cinética por lote y el valor de la  $k_{cat}$  se obtuvo de un trabajo anterior (Anexo 2). La reacción que se lleva a cabo en dicho reactor se esquematiza en la Figura 19. En la Tabla 22 se muestran los valores introducidos al simulador.

Tabla 22. Condiciones de reacción para la hidrólisis del dipalmitato de luteína.

Característica	Valor
Volumen de reacción	80%
Reacción	Hidrólisis enzimática de luteína
$k_{cat}$ (Constante de velocidad)*	$1.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
Enzima/Agua	97.5% enzima y 2.5% agua w/w
Tiempo de reacción	72 horas (inicial), 30 horas (final)
Temperatura de operación	60 °C

(\*) Los cálculos para la constante de velocidad de reacción se muestran en el anexo 2.

Este tiempo de reacción fue propuesto para saber a que tiempo la reacción de hidrólisis se detenía ó disminuía sensiblemente. Las condiciones de los demás equipos (extractor, evaporador y mezclador) se omitieron por ser los mismos que para el método tradicional.

### 4.1.3.3 Simulaciones para el proceso P 3.

#### 4.1.3.3.1 Reactor enzimático 2.

Como se explicó anteriormente en este reactor se realiza la hidrólisis del dipalmitato de luteína para obtener luteína. El simulador arrojó un perfil cinético el cual se muestra en la Figura 33, donde se muestra la disminución del dipalmitato de luteína y la aparición de luteína libre y de ácido palmítico.

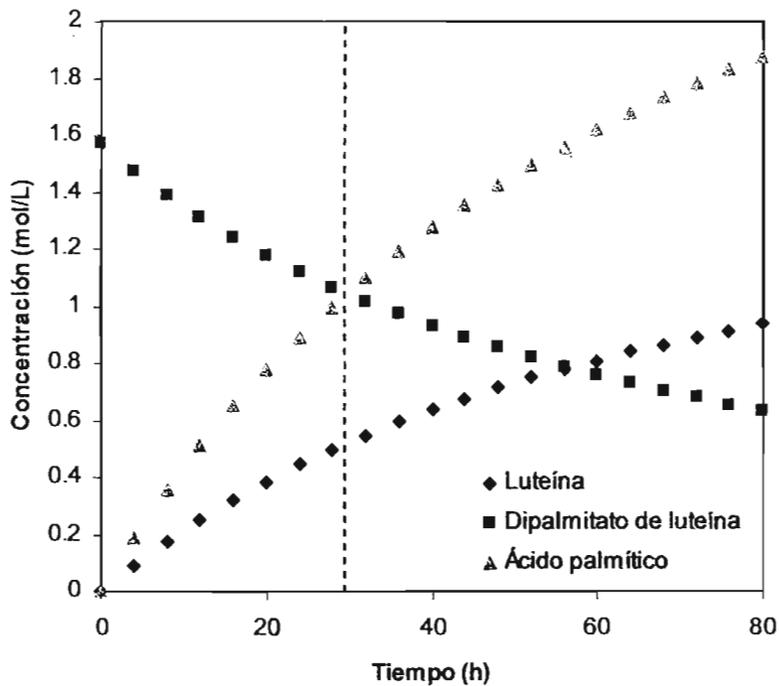


Figura 33. Cinética de hidrólisis del dipalmitato de luteína, obtenido por el SPD.

Se eligió detener la reacción a las 30 horas ya que después de ese tiempo la reacción tiende a volverse demasiado lenta. Otra razón fue que a ese tiempo los datos experimentales reportan una conversión del 51%, mientras que el simulador arrojó una conversión del 46%, valor cercano al experimental.

En este proceso se incluyó un filtro para retener a la lipasa y estableció un tiempo de 1 hora, removiendo el 100% de la enzima, la cual está soportada facilitando su separación.

También se llevó a cabo la simulación con diferentes concentraciones de enzima para ver la cinética de la reacción de hidrólisis del dipalmitato de luteína con respecto al tiempo y también con respecto a la concentración de la enzima, esto se puede apreciar en la Figura 34.

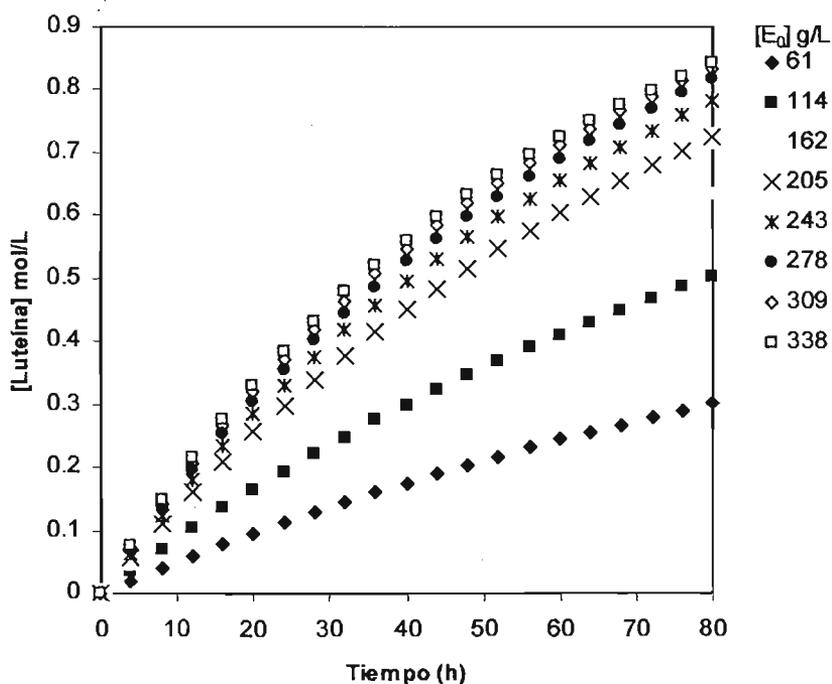


Figura 34. Gráfico de la cinética de la hidrólisis del dipalmitato de luteína con respecto al tiempo a diferentes concentraciones iniciales de lipasa.

Se obtuvo la velocidad inicial de cada corrida y se graficó contra la concentración inicial del biocatalizador, resultado que se muestra en la Figura 35. Los demás equipos se omiten ya que son los mismos que para el proceso tradicional.

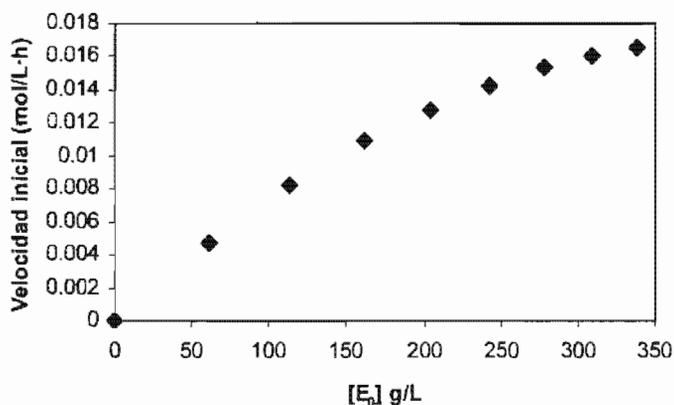


Figura 35. Gráfica que muestra la relación que guarda la velocidad inicial de la reacción con respecto a la concentración inicial.

#### 4.1.3.3.2 Tiempo de proceso.

El simulador arroja el tiempo total que dura un lote, así como el tiempo de cada uno de los equipos que conforman el proceso (Tabla 23).

Tabla 23. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 3.

Equipo	Tiempo (h)
Extractor	4.00
Mezclador	0.50
Reactor enzimático	30.75
Filtro Nutsche	4.67
Evaporador	1.00
Mezclador	0.50
Triturador	2.00
<b>Total</b>	<b>41.75</b>

El tiempo de proceso es de 7920 horas/año, por lo que se consideran 257 lotes. La Figura 36 muestra los tiempos como los proporciona el SPD en el ambiente Windows y la Figura 37 muestra tres lotes tal como se llevarían a cabo en una planta industrial, donde se implementa un programa que no tenga tiempos muertos, aunque es este caso el paso limitante del proceso está en la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína.

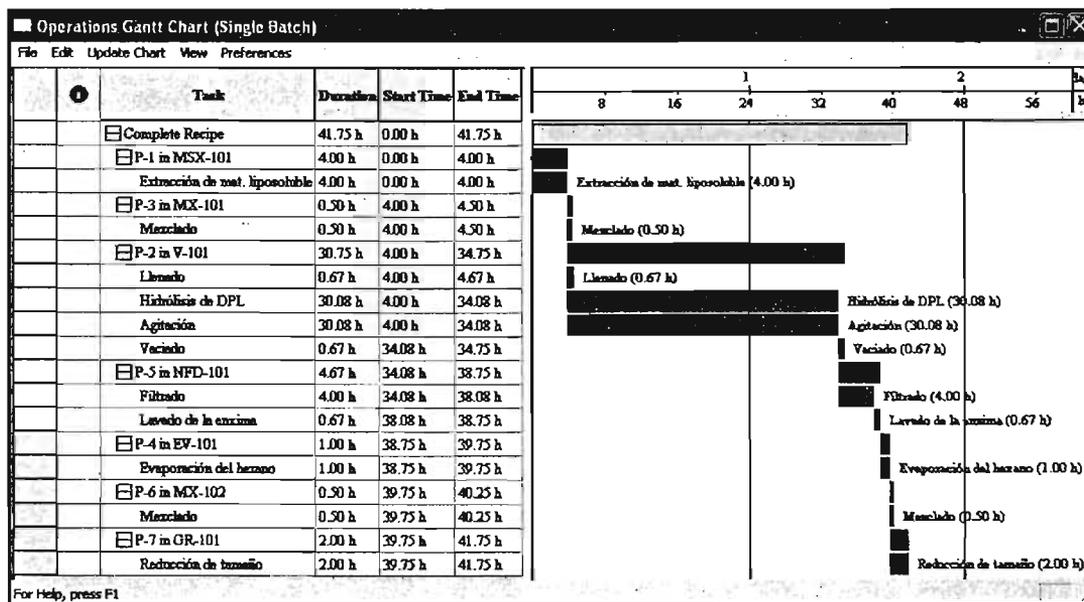


Figura 36. Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso 3, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.

#### 4.1.3.3.3 Diseño de los equipos.

La Tabla 24 muestra los datos arrojados por el simulador, pues se escogió la opción de “modo de diseño” que permite que el simulador haga las operaciones necesarias para diseñar cada uno de los equipos.

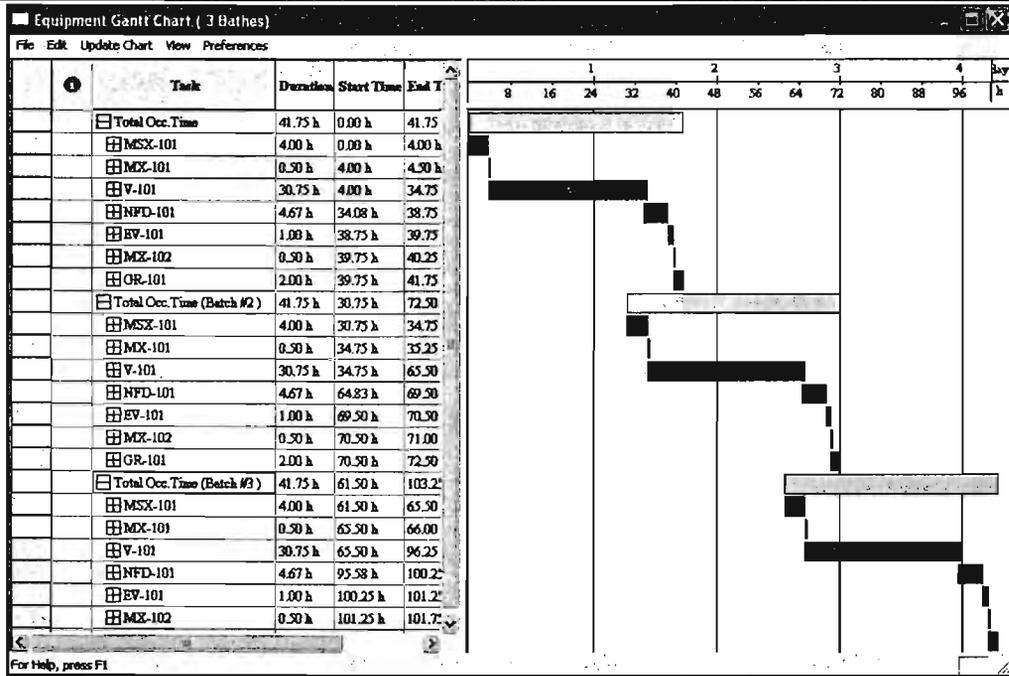


Figura 37. Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 3.

Tabla 24. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 3.

Equipo	Característica	Valor
Extractor	Rendimiento nominal	3.99 m <sup>3</sup> /h
	Volumen del mezclador	1.996 m <sup>3</sup>
	Volumen del estabilizador	3.992 m <sup>3</sup>
Mezclador 1	Rendimiento nominal	22380.87 kg/h
Reactor Enzimático	Volumen	20242.14 L
	Diámetro	5.441 m
	Altura	2.176 m
Filtro Nutsche	Área de filtrado	17.177 m <sup>2</sup>
	Volumen del recipiente	8588.672 L
Evaporador	Número de efectos	1
	Área por efecto	18.967 m <sup>2</sup>
Mezclador 2	Rendimiento nominal	1067.65 kg/h
Triturador	Rendimiento nominal	266.91 kg/h

#### 4.1.3.3.4 Salida del proceso.

Una vez que se lleva a cabo el balance de materia, se puede revisar el flujo de salida del proceso. Seleccionando la línea de salida se puede ver el contenido de ésta (ver Tabla 25). Estas se compararon con los resultados de rendimiento proporcionados por Bioquimex.

Tabla 25. Composición de luteína y xantofilas (xantofilas totales) en la salida para el proceso 3 y comparación con lo reportado por Bioquimex.

Compuesto	Velocidad de flujo (kg/lote)	Composición másica (%)
Luteína	8.39	14.13
Xantofilas	6.41	10.79
<b>Total</b>	<b>14.8</b>	<b>24.92</b>
Bioquimex		1.5

Como se puede apreciar en la Tabla 25, la cantidad de luteína libre y xantofilas es mayor que para los demás procesos, y son casi iguales entre sí. Esto debido a que la reacción enzimática de hidrólisis del dipalmitato de luteína tuvo un rendimiento de aproximadamente el 60%, por lo que hubo una producción baja de luteína libre (contra el 100% para la saponificación química). Lo interesante es que la composición másica en el flujo es mayor que la proporcionada por Bioquimex. Esto es porque se ocupan menos materiales y como consecuencia la luteína sale con una concentración mayor en el flujo principal.

4.1.4 P 4. Extracción de flor auxiliada con dos pasos enzimáticos.

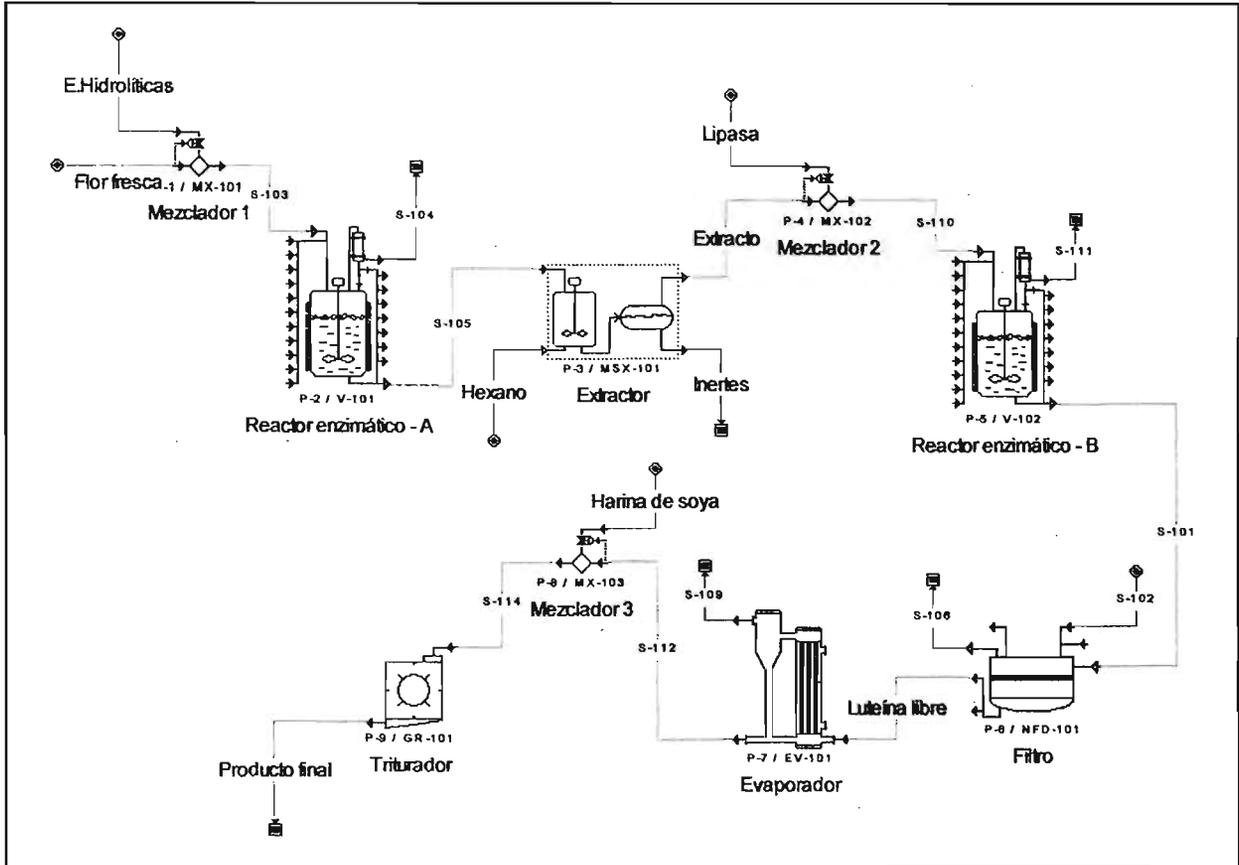
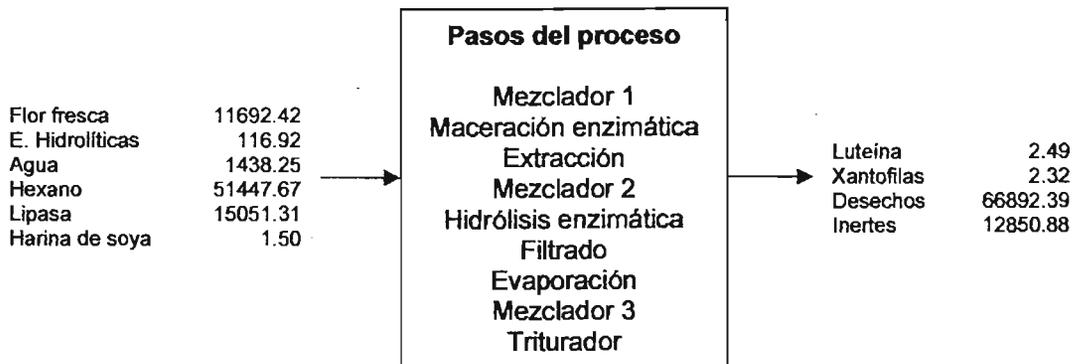


Figura 38. Diagrama del proceso 4 utilizando el SPD.

4.1.4.1 Materiales.



$$\Sigma \text{ entrada} = \Sigma \text{ salida} = 79,748.07 \text{ kg/lote}$$

Figura 39. Balance de materiales general para el proceso 4 (kg/30.7 horas).

La materia prima a utilizarse en este proceso es la flor fresca de cempasúchil y se pretende evitar el uso de bases y la formación de desechos contaminantes (Figuras 38 y 39). Las materias primas utilizadas para este proceso se muestran en la tabla 26, así como los kilogramos empleados por lote de cada uno.

Tabla 26. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso 4.

<b>Materias Primas</b>	<b>kg/lote</b>
Flor de cempasúchil fresca	11692
Enzimas hidrolíticas (Viscozyme/Neutrase)*	117
Hexano	51447
Lipasa (Novozym 435) **	15129
Agua	1361
Harina de soya	5

\* Enzima comercializada por Novo Nordisk (Dinamarca).

\*\* Esta enzima se encuentra dentro del reactor, y aunque se puede reutilizar, se considera como materia prima. Es comercializada por Novo Nordisk (Dinamarca).

#### **4.1.4.2 Condiciones de operación**

Los equipos involucrados en el proceso (extractor, mezcladores, evaporador y triturador) tienen las mismas características que los procesos anteriores; esto se hizo con el fin de poder comparar los procesos. Esto aplica también para los reactores enzimáticos.

#### 4.1.4.3 Simulaciones para el proceso P 4.

##### 4.1.4.3.1 Tiempo de proceso.

El simulador dio un tiempo de simulación por lote, así como el número de lotes, los cuales fueron 275 lotes/año con un tiempo de 30.67 horas/lote, esto considerando un tiempo anual de operación de 7920 horas. El simulador también proporciona el tiempo de cada equipo por separado (Tabla 27).

Tabla 27. Tiempo de operación de cada equipo del proceso 4.

Equipo	Tiempo (h)
Mezclador 1	0.50
Reactor enzimático 1	1.00
Extractor	4.00
Mezclador 2	0.50
Reactor enzimático 2	30.00
Filtro Nutsche	2.67
Evaporador	1.00
Mezclador 3	0.50
Triturador	2.00
<b>Total</b>	<b>30.67</b>

Como se puede apreciar en esta tabla, este es el proceso que más tiempo abarca por lote, lo que trae como consecuencia una menor productividad. Las Figuras 40 y 41 muestran las gráficas de Gantt para un lote y para varios lotes trabajando en continuo tal como se presentarían en una planta, respectivamente.

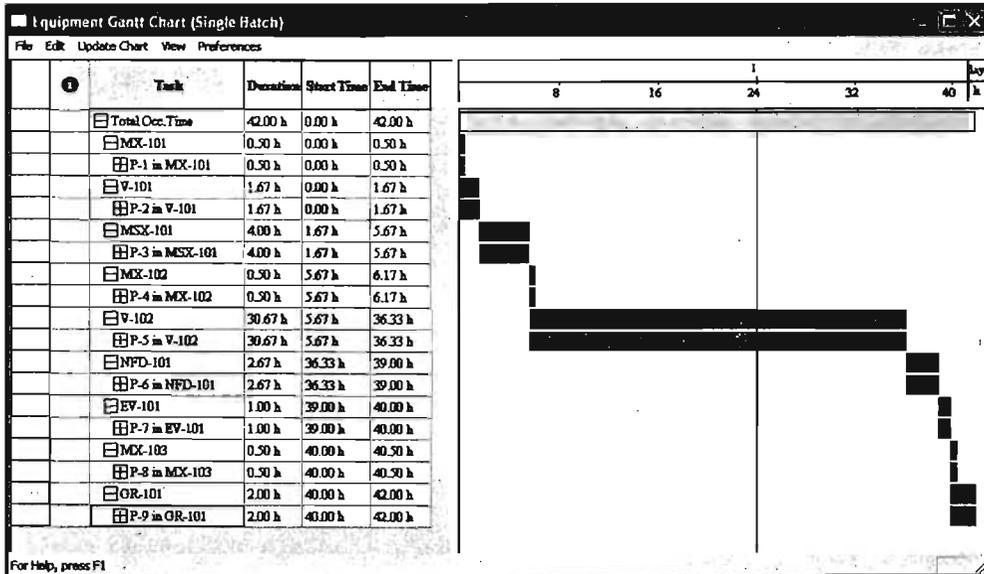


Figura 40. Gráfica de Gantt para un solo lote del proceso 4, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.

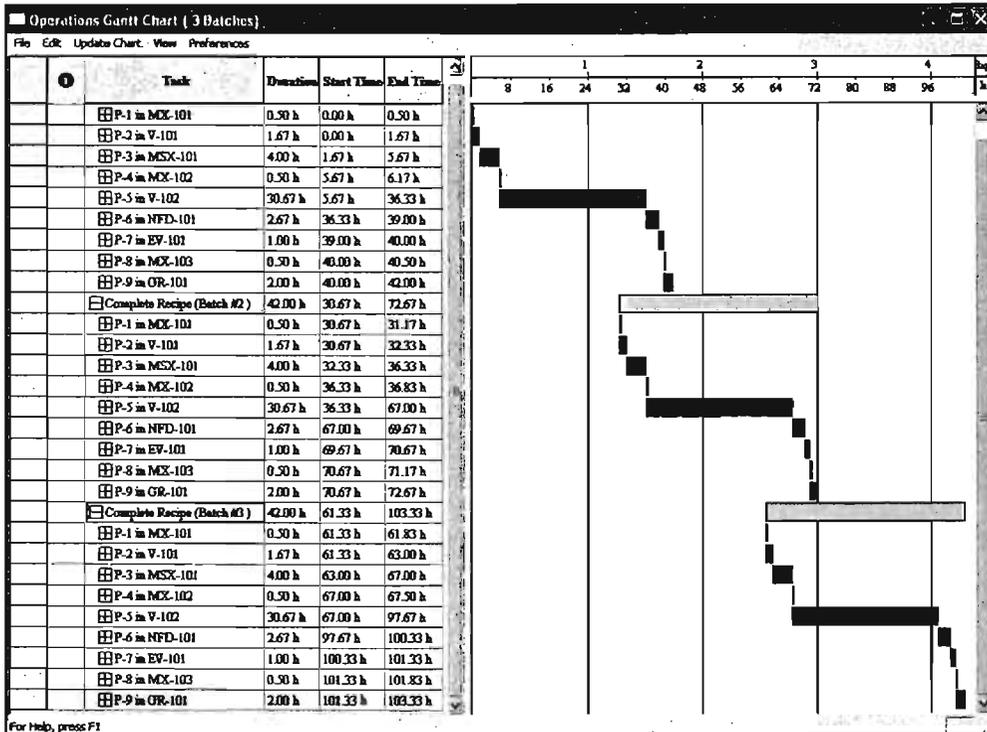


Figura 41. Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso 4.

#### 4.1.4.3.2 Diseño de los equipos.

Se eligió el tipo “modo de diseño” donde el simulador dimensiona cada uno de los equipos involucrados en el proceso. La Tabla 28 muestra las características de los equipos que se usaron para este proceso.

Tabla 28. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso 4.

<b>Equipo</b>	<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Mezclador 1	Rendimiento nominal	25 723.34m <sup>3</sup> /h
Reactor enzimático 1	Volumen	16 107.41L
	Diámetro	2.017m
	Altura	5.042m
Extractor	Rendimiento nominal	22.77 m <sup>3</sup> /h
	Volumen del mezclador	11.387 m <sup>3</sup>
	Volumen del estabilizador	22.775 m <sup>3</sup>
Mezclador 2	Rendimiento nominal	133 789.39 kg/h
Reactor Enzimático 2	Volumen	30 640.62 L
	Diámetro	2.499 m
	Altura	6.247 m
Filtro Nutsche	Área filtrante	69.446m <sup>2</sup>
	Volumen del recipiente	34 722.789 L
Evaporador	Número de efectos	1
	Área por efecto	119.529 m <sup>2</sup>
Mezclador 2	Rendimiento nominal	901.54kg/h
Triturador	Rendimiento nominal	225.38 kg/h

#### 4.1.4.3.3 Salida del proceso.

Una vez que la simulación se completó, se pueden revisar los flujos intermedios y de salida. En este caso, el que interesa es el flujo final para ver la cantidad de luteína y de xantofilas. Así se puede determinar la concentración de xantofilas totales y corroborarlo con la concentración proporcionada por Bioquimex; estos resultados aparecen en la Tabla 29.

Tabla 29. Composición de luteína y xantofilas (xantofilas totales sin luteína) en la salida para el proceso 4 y comparación con lo reportado por Bioquimex.

<b>Compuesto</b>	<b>Velocidad de flujo (kg/lote)</b>	<b>Composición másica (%)</b>
Luteína	2.49	14.7
Xantofilas	2.32	13.7
<b>Total</b>	<b>4.38</b>	<b>28.4</b>
Bioquimex		1.5

Como se puede observar en la Tabla 29, la concentración de xantofilas totales supera notablemente a la concentración porcentual que reporta Bioquimex. Esto confirma que este método es el mejor con respecto a la pureza de la luteína. A continuación se presentará el análisis financiero para cada proceso, punto clave para establecer perspectivas de potencial aplicación industrial.

## 4.2 Análisis económico.

Antes de iniciar el análisis económico, es necesario aclarar que el simulador maneja precios del 2003 en dólares.

### 4.2.1 Proceso P 1.

Las materias primas que se utilizaron se mencionan en la Tabla 30, así como los precios de cada uno de ellos.

Tabla 30. Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 1.

<b>Materias Primas</b>	<b>\$/kg</b>	<b>kg/año</b>	<b>\$/año</b>
Harina de flor de cempasúchil	1.5	1 860 891.73	2,791,338.00
Hexano	0.4	7 431 627.40	2,972,663.00
Solución de NaOH 50% w/w	4.27	647 478.53	2,764,733.00
Harina de soya	1	8 633.05	8,633.00
<b>Total</b>		<b>9 948 660.71</b>	<b>8,537,000.00</b>

El precio de la harina de flor de cempasúchil y la flor fresca (materia prima usada en otros procesos) fueron proporcionados por Bancomext y la SAGARPA.

Los precios de los equipos que se emplean en este proceso se presentan en la Tabla 31. Este precio corresponde al proporcionado con el programa tal como lo reportan los distribuidores de equipos en Estados Unidos, según el auxiliar del programa.

Si bien es cierto que el hexano se puede recuperar para utilizarlo en otro lote, en el primero se considera como materia prima inicial. El simulador lo toma en cuenta

para los gastos de producción del primer lote. La función de la harina de soya es de excipiente para la formulación de la presentación de la luteína.

Tabla 31. Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 1.

Cantidad		Equipo	Costo por unidad (dólares)	Costo final (dólares)
1/0	MSX-101	Extractor	4,000.00	4,000.00
1/0	EV-101	Evaporador	160,000.00	160,000.00
1/0	V-101	Reactor Químico	234,000.00	234,000.00
1/0	MX-101	Mezclador	0	0
1/0	GR-101	Triturador	53,000.00	53,000.00
1/0	MX-102	Mezclador	0	0
		Equipo no enlistado		113,000.00
		<b>Total</b>		<b>564,000.00</b>

El programa resume en tablas todos los datos detallados, sin embargo se mencionan los más importantes y los que determinan directamente la factibilidad de la empresa. En la Tabla 32 se puede apreciar un resumen del capital fijo estimado para el proceso 1. Se toman en cuenta desde los precios de los equipos hasta las contingencias que se puedan presentar durante la construcción y/u operación de la planta. El programa utiliza un factor para cada uno de los costos como lo llevaría a cabo una firma de ingeniería.

Tabla 32. Resumen del capital fijo estimado para el proceso 1.

A. Costo directo total de la planta (CDTP) (Costos físicos)		
1. Costo de compra del equipo (CCE)	\$	564,000.00
2. Instalación	(0.51 × CCE)	399,000.00
3. Tuberías	(0.35 × CCE)	197,000.00

4. Instrumentación	(0.40 × CCE)	226,000.00
5. Aislamiento y pintado	(0.03 × CCE)	17,000.00
6. Eléctricos	(0.01 × CCE)	56,000.00
7. Edificaciones	(0.45 × CCE)	254,000.00
8. Ampliación de la planta	(0.15 × CCE)	85,000.00
9. Servicios auxiliares	(0.40 × CCE)	226,000.00
	CDTP =	<b>2,023,000.00</b>
<b>B. Costo indirecto total de la planta (CITP)</b>		
10. Ingeniería	(0.25 × CDTP)	506,000.00
11. Construcción	(0.35 × CDTP)	708,000.00
	CITP =	<b>1,214,000.00</b>
<b>C. Costo total de la planta (CDTP + CITP)</b>		
	CTP =	<b>3,236,000.00</b>
12. Honorarios del contratista	(0.05 × CTP)	162,000.00
13. Contingencias	(0.10 × CTP)	324,000.00
	(12+13) =	485,000.00
<b>D. Capital fijo directo (CFD) CTP + 12 + 13</b>		<b>3,722,000.00</b>

El simulador también toma en cuenta el gasto de operación, que dependerá del área de la planta, del tiempo de operación de cada uno de los equipos en el lote, así como el número de personal asignado por cada área de la planta. La Tabla 33 enumera los costos de operación que va desde la materia prima a utilizar, hasta el tratamiento o disposición de las aguas residuales generadas por la planta.

La Tabla 34 muestra los gastos por tipo y por sección de la planta. Esto da una perspectiva más amplia de los gastos, pues se puede apreciar que sección genera mayores costos y en consecuencia poder mejorar el proceso de manera que se puedan disminuir los costos de producción.

Tabla 33. Resumen de costos de operación anual para el proceso 1.

Detalle de costo	\$/año
Materias primas	8,537,000.00
Dependiente de la mano de obra	594,000.00
Dependiente del equipo	1,190,000.00
Laboratorio	89,000.00
Tratamiento/eliminación de aguas residuales	908,000.00
Servicios (energía y temperatura)	49,000.00
<b>Total</b>	<b>11,368,000.00</b>

El término “servicios” incluye el suministro de energía eléctrica requerida para el funcionamiento de los equipos y el control de la temperatura para cada etapa del proceso.

Tabla 34. Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 1.

Costos	Extracción	Evaporación	Desesterificación	Trituración	Subtotal
	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año
Materia prima	5,772,634.00	0	2,764,733.00	0	8,537,367.00
Equipo	500,000.00	233,175.00	379,543.00	77,494.00	1,190,212.00
Mano de obra	230,000.00	57,500.00	295,167.00	11,500.00	594,167.00
Laboratorio	34,500.00	8,625.00	44,275.00	1,725.00	89,125.00
Aguas residuales	164,517.00	743,155.00	0	0	907,672.00
Servicios	33.00	35,534.00	2,979.00	10,899.00	49,455.00
Subtotal	6,701,684.00	1,077,990.00	3,486,697.00	10,1618.00	11,367,989.00
Contribución (%)	58.95	9.48	30.67	0.89	100

Para el análisis financiero, el simulador permite llevar a cabo un análisis de factibilidad del proceso con los precios del 2003. EL proceso es factible si el precio de venta de la luteína es de \$1,279.00 dólares, valor por debajo del precio comercial el cual se comparará al final de éste capítulo. (Tabla 35)

Tabla 35. Análisis de factibilidad para el proceso 1.

A. Capital fijo directo	\$	3,722,000.00
B. Capital de trabajo		917,000.00
C. Costo de arranque de la planta		186,000.00
D. Inversión total (A + B + C)		4,825,000.00
E. Flujo de ingresos (kg/año) Luteína		10,574
F. Costo de producción (unitario) (\$/kg) Luteína		1,075.111
G. Precio de venta (\$/kg) Luteína		1,279.272
H. Ingresos (\$/año) Luteína		13,527,000.00
I. Costo anual de operación		11,368,000.00
J. Ganancia total (H-I)		2,159,000.00
K. Impuestos (40%)		864,000.00
L. Ganancia neta (J – K + Depreciación)		1,679,000.00
Margen total		<b>15.96 %</b>
Tasa de retorno		<b>34.17%</b>
Tiempo de recuperación de la inversión		<b>2.93 años</b>

Donde:

$$\text{Margen total} = \frac{\text{Ganancia total}}{\text{Ingresos}}$$

$$\text{Tasa de retorno} = \frac{\text{Ganancia neta}}{\text{Inversión total}} \times 100\%$$

$$\text{Tiempo de recuperación} = \frac{\text{Inversión total}}{\text{Ganancia neta}}$$

#### 4.2.1.1 Análisis de sensibilidad.

Después de contar con un modelo completo para un proceso, las herramientas que tiene el SuperPro Designer pueden ser usadas para preguntar y responder “que pasaría si...?” y llevar a cabo un análisis de sensibilidad con respecto al diseño de las variables claves.

En este proceso, se evalúa solo un parámetro (número de lotes) sobre los costos de producción y se examina la factibilidad del proyecto. La Figura 42, muestra la gráfica de kilogramos de harina procesada por lote, contra el precio por kilogramo, considerando el máximo número de lotes, un valor medio y un número de lotes relativamente bajo. Como se puede apreciar, a cantidades pequeñas si hay una diferencia significativa del precio por kilogramo, pero a medida que aumenta la cantidad de harina procesada, el precio del producto final disminuye lentamente y de manera independiente del número de lotes que se establezca.

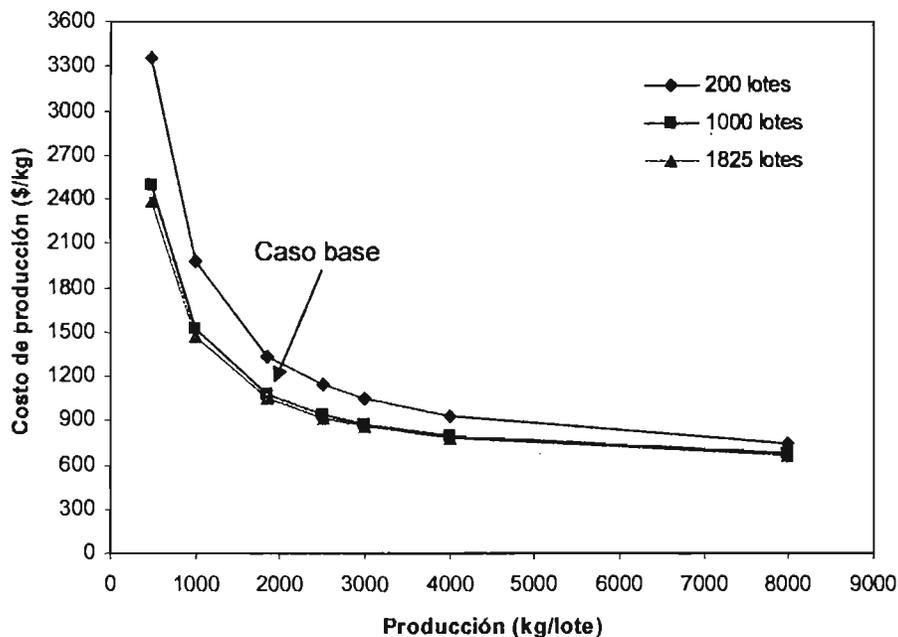


Figura 42. Costo de producción como una función del número de lotes y de la capacidad de la planta.

## 4.2.2 Proceso P 2.

Al momento de introducir las materias primas no enlistadas al simulador también se tienen que definir el precio de compra de dichos productos. En la Tabla 36 se enlistan los precios de compra de los materiales empleados en este proceso.

Tabla 36. Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 2.

<b>Materias Primas</b>	<b>\$/kg</b>	<b>kg/año</b>	<b>\$/año</b>
Flor de cempasúchil	0.15	16 813 707.54	2,522,056.00
Enzimas hidrolíticas	5.00	168 137.08	840,685.00
Hexano	0.40	67 254 830.15	26,901,932.00
Solución de NaOH 50% w/w	4.27	820 759.41	3,504,643.00
Harina de soya	1.00	7,938.08	7,938.00
Agua	0.30	1 513 233.68	453 970.00
<b>Total</b>		<b>86 353 202.32</b>	<b>33,269,000.00</b>

Como se puede apreciar el gasto más fuerte es el del hexano aún siendo una materia prima barata, pues representa el 81 % del gasto total por materias primas. A partir de este dato posteriormente se llevará a cabo un análisis de sensibilidad con respecto al precio del hexano utilizado al año con respecto al precio del producto final.

En la Tabla 37 se presentan los precios de los equipos que se emplean en este proceso; los precios fueron proporcionados por el simulador.

Tabla 37. Precios de los equipos que se utilizan en el proceso 2.

Cantidad		Equipo	Costo por unidad (dólares)	Costo final (dólares)
1/0	MX-101	Mezclador 1	0	0
1/0	V-101	Reactor enzimático 1	336,000.00	336,000.00
1/0	MSX-101	Extractor	66,000.00	66,000.00
1/0	EV-101	Evaporador	271,000.00	271,000.00
1/0	V-102	Reactor Químico	220,000.00	220,000.00
1/0	MX-102	Mezclador 2	0	0
1/0	GR-101	Triturador	5200.000	52000.00
1/0	MX-103	Mezclador 3	0	0
		Equipo no enlistado		236,000.00
		<b>Total</b>	<b>1,181,000.00</b>	<b>1,181,000.00</b>

En los gastos por equipo el precio más alto comprende al reactor enzimático. En la Tabla 38 se muestra el costo total directo y el costo total indirecto de la planta.

El equipo no enlistado involucra bombas, válvulas, empaques, llaves, mezcladores y separadores de flujos entre otros.

Tabla 38. Resumen del capital fijo estimado para el proceso 2.

A. Costo directo total de la planta (CDTP) (Costos físicos)		
1. Costo de compra del equipo (CCE)	\$	1,181,000.00
2. Instalación	$(0.51 \times \text{CCE})$	868,000.00
3. Tuberías	$(0.35 \times \text{CCE})$	413,000.00
4. Instrumentación	$(0.40 \times \text{CCE})$	473,000.00
5. Aislamiento	$(0.03 \times \text{CCE})$	35,000.00
6. Eléctricos	$(0.01 \times \text{CCE})$	118,000.00
7. Edificaciones	$(0.45 \times \text{CCE})$	532,000.00
8. Aplicación de la planta	$(0.15 \times \text{CCE})$	177,000.00
9. Servicios auxiliares	$(0.40 \times \text{CCE})$	473,000.00
	CDTP =	<b>4,271,000.00</b>
B. Costo indirecto total de la planta (CITP)		
10. Ingeniería	$(0.25 \times \text{CDTP})$	1,068,000.00
11. Construcción	$(0.35 \times \text{CDTP})$	1,495,000.00
	CITP =	<b>2,562,000.00</b>
C. Costo total de la planta (CDTP + CITP)		CTP = <b>6,833,000.00</b>
12. Honorarios del contratista	$(0.05 \times \text{CTP})$	342,000.00
13. Contingencias	$(0.10 \times \text{CTP})$	683,000.00
	$(12+13) =$	1,025,000.00
D. Capital fijo directo (CFD) CTP + 12 + 13		<b>7,858,000.00</b>

El programa proporciona información detallada de cada uno de los gastos que se originarán durante la construcción y funcionamiento de la planta. Sin embargo en este trabajo se ha simplificado la información para que sea más fácil de entender y tener una idea más clara de los resultados del análisis financiero.

En la Tabla 39 se muestran los costos más relevantes en el proceso, así como el monto total detallado de inversión del proceso.

Tabla 39. Resumen de costos de operación anual para el proceso 2.

Detalle de costo	\$/año
Materias primas	33,269,000.00
Dependiente de la mano de obra	1,450,000.00
Dependiente del equipo	1,470,000.00
Laboratorio	217,000.00
Servicios	337,000.00
<b>Total</b>	<b>36,743,000.00</b>

Tabla 40. Desglose de los pasos para el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 2.

Costos	Maceración	Extracción	Evaporación	Desesterificación	Trituración	Subtotal
	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año
Materia prima	3,824,650.00	26,901,932.00	0	2,542,169.00	0	33,268,751.00
Equipo	544,490.00	96,148.00	396,091.00	356,354.00	76,556.00	1,469,639.00
Mano de obra	599,466.00	330,740.00	82,685.00	424,450.00	12,403.00	1,449,744.00
Laboratorio	34,500.00	49,611.00	12,403.00	63,667.00	1,860.00	217,462.00
Aguas residuales	0	0	0	0	0	0
Servicios	939.00	4,770.00	321,553.00	165.00	10,022.00	337,448.00
Subtotal	5,059,465.00	27,383,202.00	812,731.00	3,386,805.00	100,841.00	36,743,044.00
Contribución (%)	13.77	74.53	2.21	9.22	0.27	100

En la Tabla 40 se puede apreciar que la extracción contribuye con un mayor porcentaje al costo total de producción es la extracción, y esto es debido a los materiales que se utilizan en ella, pues el hexano aunque es relativamente económico (0.4 dólares/kg), al utilizarse cantidades muy grandes se generan gastos fuertes que en este caso llega a abarcar mas del 70% de los costos de producción.

Tabla 41. Análisis de factibilidad para el proceso 2.

A. Capital fijo directo	\$	7,858,000.00
B. Capital de trabajo		3,187,000.00
C. Costo de arranque de la planta		393,000.00
D. Inversión total (A + B + C)		11,438,000.00
E. Flujo de ingresos (kg/año) Luteína		10,585
F. Costo de producción (unitario) (\$/kg) Luteína		3,471.371
G. Precio de venta (\$/kg) Luteína		4,166.058
H. Ingresos (\$/año) Luteína		44,096,000.00
I. Costo anual de operación		36,743,000.00
J. Ganancia total (H-I)		7,353,000.00
K. Impuestos (40%)		2,941,000.00
L. Ganancia neta (J – K + Depreciación)		5,158,000.00
Margen total		<b>16.67%</b>
Tasa de retorno		<b>45.10%</b>
Tiempo de recuperación de la inversión		<b>2.22 años</b>

#### 4.2.2.1 Análisis de sensibilidad.

Posteriormente a la obtención del modelo que rige el proceso que se desarrolla en este apartado, se pueden usar las herramientas que integran el simulador para poder determinar el cambio de precio de venta del producto final en función del cambio de precio de la materia prima con mayor valor económico.

En este proceso el hexano juega un papel fundamental pues de todas las materias primas. Aunque en la industria este disolvente se reutiliza y en el simulador se puede llevar a cabo el reúso del solvente, el programa lo considera materia prima. Por ello se llevó a cabo la variación del precio para ver como afecta a los costos de producción y por ende al precio del producto final (luteína) (Figura 43).

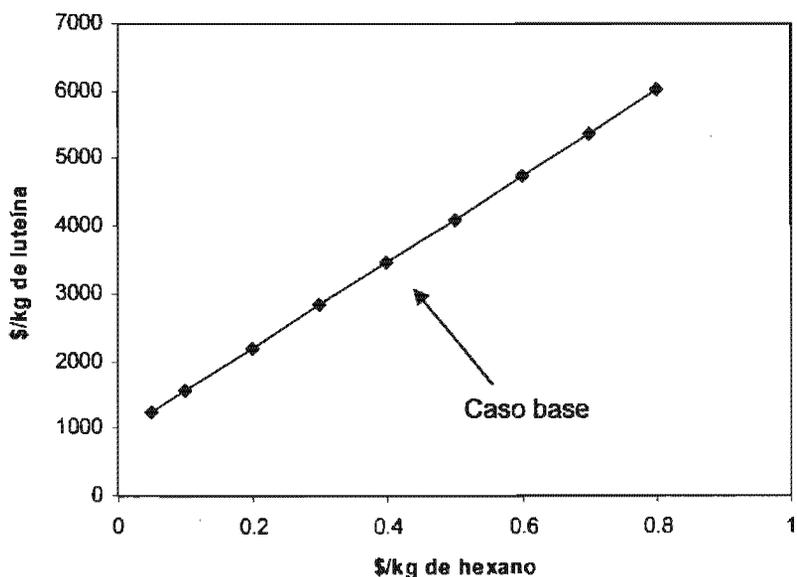


Figura 43. Costo de producción como función del precio por kilogramo de hexano.

Como se puede apreciar en la gráfica anterior los costos por el uso de hexano es directamente proporcional al costo de producción por kilogramo de luteína. Esto es una evidencia de que la cantidad del disolvente es determinante en los gastos que se tienen en el proceso en estudio.

## 4.2.3 Procesos P 3.

En la Tabla 42, se enlistan los materiales utilizados para este tercer proceso en estudio

Tabla 42. Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 3.

<b>Materias Primas</b>	<b>\$/kg</b>	<b>kg/año</b>	<b>\$/año</b>
Harina de flor de cempasúchil	1.50	1046540.25	1,569,810.00
Hexano	0.40	2093851.49	837,541.00
Lipasa	100.00	647086.89	64,708,689.00
Agua	0.30	16591.97	4,978.00
Harina de soya	1.00	1358.35	1,358.00
<b>Total</b>		<b>3805428.94</b>	<b>67,122,000.00</b>

Como se puede apreciar, la lipasa es la materia prima que influye directamente en el costo por materiales, con más del 95 % del costo total. La lipasa juega un factor importante en el proceso de extracción, pues lleva a cabo el último paso (hidrólisis) en la extracción de luteína. Por ende es importante si se quiere tener un precio competitivo en el mercado encontrar lipasas y baratas.

En la Tabla 43 se enlistan los equipos que se utilizan en este proceso, así como los precios de venta, de cada uno, y la suma total de los equipos, para el 2003. Los precios están en dólares.

Tabla 43. Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 3.

Cantidad		Equipo	Costo por unidad (dólares)	Costo final (dólares)
1/0	MSX-101	Extractor	24,000.00	24,000.00
1/0	MX-101	Mezclador 1	0	0
1/0	V-101	Reactor enzimático 2	354,000.00	354,000.00
1/0	NFD-101	Filtro Nutsche	216,000.00	216,000.00
1/0	EV-101	Evaporador	105,000.00	105,000.00
1/0	MX-102	Mezclador 2	0	0
1/0	GR-101	Triturador	52,000.00	52,000.00
		Equipo no enlistado		188,000.00
		<b>Total</b>		<b>939,000.00</b>

Como se puede apreciar, el equipo con mayor costo es el reactor enzimático. Al igual que en el reactor enzimático del proceso anterior se debe a las características y tamaño de dicho reactor que son muy particulares.

En la Tabla 44, se muestran a detalle cada uno de los gastos que conforman el capital fijo el cual es calculado por el simulador, en base al precio total gastado en los equipos y las materias primas. El programa se basa en factores que determina para cada tipo de gasto. Estos cálculos incluyen los costos directos, indirectos, el costo total y en consecuencia el capital fijo directo.

Tabla 44. Resumen del capital fijo estimado para el proceso 3.

<b>A. Costo directo total de la planta (CDTP) (Costos físicos)</b>		
1. Costo de compra del equipo (CCE)	\$	939,000.00
2. Instalación	(0.51 × CCE)	646,000.00
3. Tuberías	(0.35 × CCE)	329,000.00
4. Instrumentación	(0.40 × CCE)	376,000.00
5. Aislamiento y pintado	(0.03 × CCE)	28,000.00
6. Eléctricos	(0.01 × CCE)	94,000.00
7. Edificaciones	(0.45 × CCE)	422,000.00
8. Ampliación de la planta	(0.15 × CCE)	141,000.00
9. Servicios auxiliares	(0.40 × CCE)	376,000.00
	<b>CDTP =</b>	<b>3,350,000.00</b>
<b>B. Costo indirecto total de la planta (CITP)</b>		
10. Ingeniería	(0.25 × CDTP)	838,000.00
11. Construcción	(0.35 × CDTP)	1,173,000.00
	<b>CITP =</b>	<b>2,010,000.00</b>
<b>C. Costo total de la planta (CDTP + CITP)</b>		
	<b>CTP =</b>	<b>5,360,000.00</b>
12. Honorarios del contratista	(0.05 × CTP)	268,000.00
13. Contingencias	(0.10 × CTP)	536,000.00
	<b>(12+13) =</b>	<b>804,000.00</b>
<b>D. Capital fijo directo (CFD) CTP + 12 + 13</b>		<b>6,164,000.00</b>

En la Tabla 45 se enlistan los costos de operación anual, que incluyen la mano de obra, las materias primas, los costos que dependen de los equipos, etc. Dichos costos determinarán directamente los costos de producción para poder establecer el precio de venta del producto final.

Tabla 45. Resumen de costos de operación anual para el proceso 3.

Detalle de costo	\$/año
Materias primas	67,122,000.00
Dependiente de la mano de obra	674,000.00
Dependiente del equipo	1,154,000.00
Laboratorio	101,000.00
Servicios	14,000.00
<b>Total</b>	<b>69,065,000.00</b>

Como se puede apreciar en la tabla anterior, el costo de operación anual, depende fundamentalmente de las materias primas que como se vio anteriormente, va a depender de la cantidad de enzima que se utilice y del precio de ésta. Cabe mencionar, tal como se vio anteriormente que la materia prima que más gastos genera es la lipasa, por ende es la materia prima limitante en este proceso.

En la Tabla 46 se muestran los gastos clasificados por etapa.

Tabla 46. Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso 3.

Costos	Extracción	Hidrólisis	Evaporación	Trituración	Subtotal
	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año
Materia prima	2,407,043.00	64713975.00	0	1358.00	67,122,375.00
Equipo	35,527.00	888,967.00	153,230.00	76,115.00	1,153,839.00
Mano de obra	59,110.00	597,380.00	14,778.00	2,956.00	674,223.00
Laboratorio	8,867.00	8,960.007	2,217.00	443.00	10,1134.00
Aguas residuales	0	0	0	0	0
Servicios	156.00	2,112.00	9,625.00	1,715.00	13,608.00
Subtotal	2,510,702.00	66,292,041.00	179,850.00	82,587.00	69,065,180.00
Contribución (%)	3.64	95.98	0.26	0.12	100.00

Como se puede apreciar en esta tabla, la hidrólisis enzimática de la luteína es la que más gastos conlleva, con más del 95 %.

En la Tabla 47, se sintetiza el análisis financiero, en este caso el simulador hace un resumen y un análisis de factibilidad del proceso. Se desprende que el análisis es factible, siempre y cuando el precio de venta sea de \$34,995.00 pesos/kg de luteína. Como se puede apreciar el precio es más elevado que el precio del proceso tradicional, pero sin los inconvenientes que dicho proceso conlleva si el producto final es orientado para consumo humano.

Tabla 47. Análisis de factibilidad para el proceso 3.

A. Capital fijo directo	\$	6,164,000.00
B. Capital de trabajo		6,169,000.00
C. Costo de arranque de la planta		308,000.00
D. Inversión total (A + B + C)		12,642,000.00
E. Flujo de ingresos (kg/año) Luteína		2156.20
F. Costo de producción (unitario) (\$/kg) Luteína		32,031.15
G. Precio de venta (\$/kg) Luteína		34,995.15
H. Ingresos (\$/año) Luteína		75,456,000.00
I. Costo anual de operación		69,065,000.00
J. Ganancia total (H-I)		6,391,000.00
K. Impuestos (40%)		2,556,000.00
L. Ganancia neta (J – K + Depreciación)		4,420,000.00
Margen total		<b>8.47 %</b>
Tasa de retorno		<b>34.96 %</b>
Tiempo de recuperación de la inversión		<b>2.86 años</b>

Otro factor que influye sobremanera en la tasa de producción es el número de lotes, pues el tiempo de residencia en el reactor enzimático es muy largo, por lo que se considera que el factor limitante es la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína.

#### 4.2.3.1 Análisis de sensibilidad.

Como se vio anteriormente, el precio de la lipasa y el tiempo de residencia del flujo principal en el reactor enzimático son dos puntos cruciales para que el precio del producto final se eleve considerablemente. Por ende en este apartado se analizará la dependencia del precio de venta con respecto al tiempo de residencia en el reactor enzimático, así como del precio de la lipasa. La Figura 44 muestra dichos cambios.

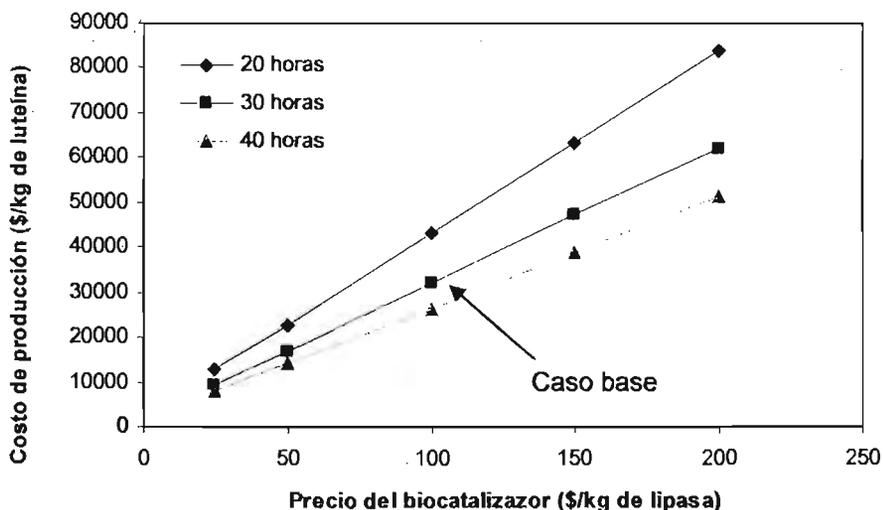


Figura 44. Costo de producción en función del precio del biocatalizador empleado en la hidrólisis de los diésteres de luteína y en el número de horas de residencia en el reactor enzimático.

Se nota un comportamiento inversamente proporcional con respecto al tiempo de residencia. Por su parte al aumentar el precio de la lipasa aumenta el costo de producción.

**4.2.4. Proceso P 4.**

En la Tabla 48 se enlistan los materiales que se alimentan al proceso así como el precio por kilogramo, los kilogramos utilizados y el precio final de cada producto al año.

Tabla 48. Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso 4.

<b>Materias Primas</b>	<b>\$/kg</b>	<b>kg/año</b>	<b>\$/año</b>
Flor fresca de cempasúchil	1.50	3004953.29	450,743.00
Agua	0.30	275974.96	82,792.00
Enzimas hidrolíticas	5.00	30049.53	150,248.00
Hexano	0.40	926228.00	370,491.00
Lipasa	100.00	270929.02	27,092,902.00
Harina de soya	1.00	332.97	333.00
<b>Total</b>		<b>15026130.00</b>	<b>28,148,000.00</b>

Como era de esperarse el precio de la lipasa hace que este representa más del 96 % del costo total de la materia prima empleada para este proceso. Sobrepasa por mucho al costo anual de las enzimas hidrolíticas que se emplean en la maceración ya que éstas apenas cubren el 0.11% del precio final por materiales.

En la Tabla 49, se enlistan los equipos a utilizarse en este proceso, así como la cantidad de equipos y la suma del costo total de los equipos.

Tabla 49. Precio de los equipos que se utilizan en el proceso 4.

Cantidad		Equipo	Costo por unidad (dólares)	Costo final (dólares)
1/0	MX-101	Mezclador 1	0	0
1/0	V-101	Reactor enzimático 1	336,000.00	336,000.00
1/0	MSX-101	Extractor	21,000.00	21,000.00
1/0	MX-101	Mezclador 1	0	0
1/0	V-102	Reactor enzimático 2	315,000.00	315,000.00
1/0	NFD-101	Filtro Nutsche	216,000.00	216,000.00
1/0	EV-101	Evaporador	77,000.00	77,000.00
1/0	MX-103	Mezclador 3	0	0
1/0	GR-101	Triturador	52,000.00	52,000.00
		Equipo no enlistado		254,000.00
		<b>Total</b>		<b>1,270,000.00</b>

Como se puede apreciar el precio del reactor donde se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de los ésteres de luteína es el equipo más costoso.

La Tabla 50, muestra un resumen de los cálculos realizados para obtener el capital fijo estimado. Estas operaciones las hace el simulador y forman parte del reporte de evaluación económica, el cual tiene la finalidad de presentar paso a paso el análisis financiero del proceso en estudio.

Tabla 50. Resumen del capital fijo estimado para el proceso 4.

A. Costo directo total de la planta (CDTP) (Costos físicos)		
1. Costo de compra del equipo (CCE)	\$	1,270,000.00
2. Instalación	(0.51 × CCE)	961,000.00
3. Tuberías	(0.35 × CCE)	445,000.00
4. Instrumentación	(0.40 × CCE)	508,000.00
5. Aislamiento y pintado	(0.03 × CCE)	38,000.00
6. Eléctricos	(0.01 × CCE)	127,000.00
7. Edificaciones	(0.45 × CCE)	572,000.00
8. Ampliación de la planta	(0.15 × CCE)	191,000.00
9. Servicios auxiliares	(0.40 × CCE)	508,000.00
	CDTP =	<b>4,620,000.00</b>
B. Costo indirecto total de la planta (CITP)		
10. Ingeniería	(0.25 × CDTP)	1,155,000.00
11. Construcción	(0.35 × CDTP)	1,617,000.00
	CITP =	<b>2,772,000.00</b>
C. Costo total de la planta (CDTP + CITP)		
	CTP =	<b>7,391,000.00</b>
12. Honorarios del contratista	(0.05 × CTP)	370,000.00
13. Contingencias	(0.10 × CTP)	739,000.00
	(12+13) =	1,109,000.00
D. Capital fijo directo (CFD) CTP + 12 + 13		<b>8,500,000.00</b>

La Tabla 51 enlista los costos de operación anuales, de una manera global, esto con el fin de ver que tipo de costo es el que influye más en los costos por operación.

Tabla 51. Resumen de costos de operación anual para el proceso 4.

Detalle de costo	\$/año
Materias primas	28,148,000.00
Dependiente de la mano de obra	856,000.00
Dependiente del equipo	1,589,000.00
Laboratorio	128,000.00
Servicios	6,000.00
<b>Total</b>	<b>30,727,000.00</b>

Como se puede apreciar, el costo más elevado en esta tabla se debe a las materias primas empleadas. En la Tabla 48 se muestran los gastos por materias primas, por ende la lipasa es responsable que el costo por materias primas sea el más elevado de los costos de operación. Esto también va aunado al proceso de hidrólisis enzimática que hace que la velocidad de producción se vea disminuida, aumentando los costos del proceso de producción de luteína libre.

En la Tabla 52 se muestra el análisis de factibilidad para el proceso 4. Esta tabla representa los costos más importantes, el costo de producción por kilogramo de luteína, el precio de venta de la luteína en este proceso, la tasa de retorno y el tiempo de recuperación de la inversión.

Tabla 52. Análisis de factibilidad para el proceso 4.

A. Capital fijo directo	\$	8,500,000.00
B. Capital de trabajo		2,643,000.00
C. Costo de arranque de la planta		425,000.00
D. Inversión total (A + B + C)		11,568,000.00
E. Flujo de ingresos (kg/año) Luteína		431.73
F. Costo de producción (unitario) (\$/kg) Luteína		71,170.86
G. Precio de venta (\$/kg) Luteína		74,001.42
H. Ingresos (\$/año) Luteína		31,949,000.00
I. Costo anual de operación		30,727,000.00
J. Ganancia total (H-I)		1,222,000.00
K. Impuestos (40%)		489,000.00
L. Ganancia neta (J – K + Depreciación)		1,541,000.00
Margen total		<b>3.83 %</b>
Tasa de retorno		<b>13.32 %</b>
Tiempo de recuperación de la inversión		<b>7.51 años</b>

Como se puede apreciar el precio de venta del producto final es elevado en comparación con los demás procesos; sin embargo la sustitución de compuestos que están prohibidos por las instancias gubernamentales especializadas, así como la nula producción de efluentes altamente contaminantes, hacen de este proceso el más interesante y con mayor futuro, por lo que es recomendable seguir optimizándolo para hacerlo industrialmente atractivo.

#### **4.2.4.1 Análisis de sensibilidad.**

Este proceso tiene varios puntos críticos que limitan su factibilidad para implementarlo a nivel industrial. Como se mencionó anteriormente el precio de la lipasa y el tiempo de residencia del flujo principal en el reactor enzimático empacado con el biocatalizador, son los puntos que más influyen el proceso. En la figura 49 se muestra este comportamiento. En consecuencia se tienen que encontrar otros biocatalizadores y/o solventes y co-solventes que incrementen la velocidad de reacción, aumentando la conversión a tiempos cortos, al mismo tiempo que una reducción importante en el costo operativo de estos catalizadores.

### 4.3 Comparación de los procesos.

Una vez que se llevó a cabo la simulación de cada uno de los tres procesos en etapa de desarrollo, se comparan con el precio tradicional, para ver las diferencias significativas. Esto es con el fin de ver las ventajas y desventajas de cada uno de los procesos en conjunto y poder tener una visión más amplia de todos ellos y sus etapas.

Esta tabla también tiene como finalidad comparar los precios de venta del producto final, para compararlos con el precio comercial de la luteína, datos que se obtuvieron de la página electrónica de la compañía Green Canyon Inc., líder en el mercado en la comercialización de productos naturales orientados para consumo humano y utilizados como auxiliares en el tratamiento de algunos padecimientos (Green Canyon, 2005).

La Tabla 53 muestra el comparativo de los procesos para la obtención de luteína libre; algunos procesos por su naturaleza se orientan para la industria avícola, mientras que otros son para consumo humano. En el anexo 4 se plantea la purificación de la luteína una vez que sale del reactor donde se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de los ésteres de luteína, incluyendo una columna de adsorción, evaporadores y la inclusión de estabilizantes para que la luteína sea más resistente a la luz y el calor.

Cabe hacer mención en esta parte del trabajo que se tuvieron que adaptar los procesos a las operaciones unitarias que incluye el simulador, tratando de ser lo más apegado posible a la realidad.

Tabla 53. Comparativo de los tres procesos en estudio con el método tradicional; datos obtenidos por el simulador SuperPro Designer.

Proceso	Tiempo de proceso (h/lote)	Productividad		Costo de producción (\$/kg de luteína)	Tasa de retorno	Tiempo de recuperación (años)	Precio de venta (\$/kg de luteína)
		Materia prima	(kg/lote)				
1	10	Harina	1,861	1,075.00	34.17 %	2.9	1,279.00
2	11.83	Flor fresca	11,692	3,471.00	45.10 %	2.2	4,166.00
3	41.75	Harina	4,072	32,031.15	34.96 %	2.9	34,995.00
4	30.67	Flor fresca	11,692	71,171.00	13.32%	7.5	74,000.00
<b>Green Canyon (consumo humano)</b>							91, 170.00
<b>I. Q. F. ENAMEX (consumo avícola)</b>							1,498.50
<b>Sigma-Aidrich (Reactivo analítico) (\$/1 g de luteína)</b>							113,339.76

I. Q. F. ENAMEX, ubicada en el estado de Veracruz, proporcionó el precio de la luteína para aves de corral que la empresa comercializa. Se tomó como referencia para compararlo con los precios de venta obtenidos por el simulador, ya que fue la única compañía a nivel nacional que brindó dicha información.

Como se puede apreciar en la tabla anterior, el proceso tradicional sigue siendo al proceso más rentable, pues presenta un menor costo de producción por kilogramo de producto final producido. Sin embargo, este no puede ser orientado hacia consumo humano, por lo que sólo puede ser aplicado como pigmento para aves de engorda y de postura.

Los procesos 2 y 4, tienen la misma cantidad en la alimentación, ya que los dos tienen flor fresca de cempasúchil como materia prima principal sin sufrir algún cambio importante. Con la diferencia de que el proceso dos sólo utiliza enzimas macerantes, mientras que el proceso cuatro, utiliza también lipasas, biocatalizador que es relativamente caro en comparación a las demás materias primas.

El tiempo de proceso también afecta a la productividad, ya que mientras el proceso 2 dura 11.83 horas, el proceso 4 dura 30.67 horas, por lo que procesa menos materia prima al año, teniendo como consecuencia una menor producción de luteína y menos ganancias.

Cabe mencionar que el proceso 4 utiliza equipos de mayor tamaño, lo que encarece el precio de venta del producto final. Esto hace que la tasa de retorno sea menor para este proceso y un mayor tiempo de recuperación de la inversión. A medida que se fueron presentando los resultados de cada una de las simulaciones, se observó que la lipasa es la materia prima más cara de todos los procesos y quien influye directamente en el precio de venta de la luteína.

#### **4.3.1 Determinación del paso limitante.**

El paso limitante es la hidrólisis enzimática de los ésteres de luteína. El tiempo de residencia es el más largo que se presenta en los procesos, con una duración de 30 horas. Esto tiene como consecuencia que haya un menor número de lotes, disminuyendo la productividad. Por ende es este paso en donde se ha enfocado la investigación para optimizar dicho proceso.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 5. 1 Conclusiones.

De acuerdo con los objetivos planteados en esta investigación, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Se utilizó el simulador comercial SuperPro Designer (Intelligen Inc.), para simular los tres procesos en etapa de desarrollo así como el proceso tradicional de producción de luteína. Para el proceso 2 se obtuvo un tiempo de proceso de 11.8 horas, una velocidad de producción de 11, 642 kg/lote de flor fresca, un costo de producción de \$ 3,471.00 y un precio de venta de producto final de \$ 4,166.00/kg.

El proceso 3, tiene un tiempo de proceso de 41.7 horas, una velocidad de producción de 4072 kg/lote de harina de flor, un costo de producción de \$ 32, 031.00 y un precio de venta del producto final de \$ 34, 995.00/kg. El proceso 4, donde se combinan ambos procesos anteriores, dio un tiempo de proceso de 30.7 horas, una velocidad de producción de 11692 kg/lote de flor fresca, un costo de producción de \$ 71,171.00 y un precio de venta del producto final de \$ 74,000.00/kg.

En los dos primeros procesos de estudio, se obtuvo el tiempo de mayor rendimiento con base en los datos cinéticos obtenidos de las fuentes de información. Para el primer proceso, se estableció un tiempo de maceración de una hora, basados en la información de la literatura que recomienda una hora de maceración como suficiente para extraer la mayor parte del material soluble en disolventes orgánicos.

Para el proceso donde se ocupan lipasas como agentes de hidrólisis de los ésteres de luteína, la reacción se puede llevar a 72 horas para obtener un conversión aproximada al 70% de ésteres. Sin embargo, el tiempo de proceso es

largo si se quiere escalar a nivel industrial, por lo que se propuso un tiempo de reacción de 30 horas, donde se presenta una conversión de alrededor del 50% de ésteres de luteína.

Por consecuencia, el paso limitante en los procesos descritos, es la hidrólisis enzimática, con un tiempo de residencia del flujo principal en el reactor de 30 horas.

También se simuló el proceso 1, obteniéndose un tiempo de proceso de 10 horas, una velocidad de producción de 1860 kg/lote de harina de flor, un costo de producción de \$ 1,075.00 y un precio de venta del producto final de \$ 1,279.00/kg. Si se compara este proceso con los demás en etapa de desarrollo, la diferencia es significativa. Esto es debido a que los materiales utilizados son más económicos. Sin embargo, no se puede orientar para consumo humano, como sería el caso de los otros procesos.

Si se quisiera orientar para consumo humano, se tendría que tener otra estrategia de hidrólisis de los ésteres de luteína, ya que el empleo de soluciones básicas está restringido para procesos de producción de alimentos grado alimenticio, según Código de regulaciones federales (CRF) de la administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos (FDA, 2004).

De los procesos analizados, el más rentable es el proceso 2; sin embargo, el proceso 3 podría ser considerado como rentable. En una investigación realizada para conocer los precios de luteína en el mercado, se encontraron precios desde \$ 1,498.50/kg hasta precios muy elevados, lo que indica que el precio de venta va a depender de la materia prima, del tipo de proceso y del uso al que esté destinado.

También se pueden proponer varios lotes trabajando de manera paralela. En este caso, el costo inicial de la planta va a ser más elevado, sin embargo se puede

tener una mayor tasa de retorno y un menor tiempo de recuperación de la inversión.

El proceso menos rentable, fue el proceso 4 el cual es una combinación de los procesos 2 y 3. Sin embargo, cabe mencionar que los equipos de este proceso tienen mayores dimensiones a los demás procesos, ya que a diferencia del proceso dos, el tercer proceso utiliza como materia prima principal la flor fresca. Dado que todo el proceso se lleva a cabo en medio orgánico, el evaporador se encuentra al final, a diferencia del primer proceso donde también se utiliza flor como materia prima. Esto hace que los equipos tengan una mayor capacidad para poder recibir todo el flujo principal, encareciendo sobremanera el precio de venta del producto final.

Cabe hacer mención que al final de cada uno de los tratamientos se llevará a cabo una purificación del extracto, esto con el fin de que sea apto para consumo humano. Para todos los procesos mencionados, el costo de purificación es el mismo, pues el equipo y los insumos a utilizar son iguales, de tal manera que la hacer la comparación no se tomó en cuenta la etapa de purificación. Sin embargo en el anexo 4 se presenta dicha etapa, evaluada técnica y económicamente. Para tener una idea de cuanto se incrementan los costos, hay que sumar los costos de producción de la extracción con los costos de purificación y así poder obtener el costo de producción de luteína para consumo humano.

El SuperPro Designer ofrece grandes ventajas sobre otros simuladores comerciales, principalmente por la accesibilidad del ambiente del programa, el cual es de fácil manejo para el usuario, así como la presentación de los resultados obtenidos de las simulaciones. Este programa ofrece una ayuda para aquellos profesionales que no estén familiarizados con los procesos químicos y bioquímicos, pero que sin embargo requieren usarlo para tomar una decisión de acuerdo a la integración de una nueva línea de producción o ampliación de la planta. Cuenta con una base de datos muy completa, lo cual permite simular casi

cualquier proceso de la industria química y biotecnológica; también es factible crear una base de datos dentro del programa, en el cual se pueden agregar materiales que se requieran para la simulación, haciéndolo atractivo a cualquier grupo de desarrollo encargado desde la generación de ideas, desarrollo, selección y diseño del proceso hasta su implementación a nivel industrial.

## 5.2 Recomendaciones.

- ❖ El simulador empleado en este trabajo utiliza criterios de los Estados Unidos para el diseño de plantas industriales. Sin embargo dichos criterios no siempre aplican en cualquier país, por lo que sería recomendable adecuar los criterios de construcción y puesta en marcha de una planta procesadora a los que aplican en México.
- ❖ El programa proporciona el precio de venta de los equipos tal como se comercializan en Estados Unidos. Hay empresas en México que se encargan de fabricar equipos industriales con costos menores, lo que puede influir directamente en los costos de producción. Como se mencionó anteriormente el simulador tiene la alternativa de que él proporcione los precios o de que el usuario lo haga. Para este caso, se prefirió que el simulador llevara a cabo la estimación de los costos de los equipos.
- ❖ Para este estudio, el precio de las materias primas principales (flor fresca y harina de flor de cempasúchil) fueron obtenidos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), pero los precios de compra de algunas materias primas como el hexano, el excipiente y las soluciones básicas fueron proporcionadas por el simulador. Este trabajo sería más confiable si todos los precios fueran proporcionados por distribuidores comerciales nacionales.

- ❖ Por todo esto, lo que se recomienda es adaptar el simulador a las características y necesidades de nuestro país, desde los costos de las materias primas, hasta la depreciación de los equipos y el pago de impuestos. Esto con el fin de llevar la aplicación académica a una aplicación práctica de interés para la industria mexicana.
  
- ❖ Otro punto importante es el precio de la lipasa, pues la reacción es todavía muy lenta para irimplementarla a nivel industrial. Por otro lado el precio de esta enzima es elevado, pero se puede utilizar para varios lotes.
  
- ❖ Se recomienda encontrar otro tipo de biocatalizadores más económicos o el empleo de solventes o cosolventes que promuevan la reacción incrementado la producción de luteína libre. Este paso es el factor limitante del proceso, y el cual determina la factibilidad del proceso.
  
- ❖ Otra recomendación sería el llevar a cabo procesos en paralelo, es decir varias líneas de producción del mismo proceso trabajando al mismo tiempo para alcanzar una mayor producción, tal como se hace a nivel industrial. Si bien esto incrementaría algunos costos, como el de mano de obra, de mantenimiento de los equipos, tuberías, etc; sin embargo, es una buena opción si se construyen reactores más pequeños para trabajar flujos menores que faciliten las bioconversiones en los reactores enzimáticos.

## REFERENCIAS

ALCOSA S. A. de C. V. Pigmentos Naturales para la Industria Avícola. [www.alcosa.com.mx](http://www.alcosa.com.mx). 2005. México D. F.

BANCOMEXT (Banco de Comercio Exterior). Informes de Comercio Exterior y Estadísticas. [www.bancomext.com](http://www.bancomext.com). México D. F. 2004.

Bárzana G. E., D. Rubio, R. I. Santamaría, O. García-Correa, F. García, V. E. Ridaura, A. López-Munguía "Enzyme-Mediated Solvent Extraction of Carotenoids from Marigold Flower" (*Tagetes erecta*) *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4491-4496.

BIOQUIMEX. "Lutein". Xantopina Plus. With an Eye on Health. Artículo publicado por Bioquimex Nutrition. México D. F. 2002.

Bone R. A., J. T. Landrum, S. L. Tarsus "Preliminary Identification of the Human Macular Pigment" *Vision Res.* 25(1985)1531-1535

Bone R. A., J. T. Landrum, et al. "Macular Pigment in Donor Eyes with and without AMD: A Case-control Study" *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 42 (2001) 235-40.

Bowen P. E., S. M. Herbst-Espinosa, E. A. Hussain, M. Stacewicz-Sapuntzakis "Esterification Does Not Impair Lutein Bioavailability in Humans" *Human Nut. Metab.* 22 (2002) 3668-3673.

Breithaupt D. E; A. Bamedi, U. Wirt "Carotenol Fatty Acid Esters: Easy Substrates for Digestive Enzymes?" *Comp. Biochem. Physiol.* 132B (2002) 721-728.

Brush A. H. "Metabolism of Carotenoid Pigments in Birds" *FASEB J.* 4(2000)2969-2977.

Casarrubias M; J. G. Hernández "Degradación Anaerobia de Aguas derivadas del Ensilado y Prensado del Cempasúchil (*Tagetes erecta*)" Tesis Profesional. FES Zaragoza. UNAM. 1996. México D. F.

Castenmiller J. J. M., C. E. West "Bioavailability and Bioconversion of Carotenoids" *Annu. Rev. Nutr.* 18 (1998) 445-449.

Código de Regulaciones Federales. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA) [www.cfan.fda.gov](http://www.cfan.fda.gov). 2004. México D. F.

Cooper D. A., D. R. Webb, J. C. Peters "Evaluation of the Potential for Olestra to Affect the Availability of Dietary Phytochemicals" *Am. Soc. Nutr. Sci.* 127 (1997) 16995-17095.

Delgado-Vargas F., O. Paredes-López "Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles" *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997/a) 1097-1102.

Delgado-Vargas F., O. Paredes-López "Effects of Enzymatic Treatments on Carotenoid Extraction from Marigold Flowers (*Tagetes erecta*)" *Food Chem.* 58 (1997/b) 255-258.

Dominguez H., M. J. Núñez, J. M. Lema "Enzyme-assisted Hexane Extraction of Soybean Oil" *Food Chem.* 54 (1995) 223-231.

Dossat V; D. Combes, A. Marty "Lipase-catalized transesterification of high oleic sunflower oil" *Enz. Microb. Technol.* 30 (2002) 90-94.

Flora, J. R. V., A. S. Mc Anally, D. P. Petrides "Treatment Plant Instructional Modules based on SuperPro Designer<sup>®</sup> v.2.7" *Env. Model. & Software* 14 (1999) 69-80.

González M. E; G. Loarca-Piña, M. Ramos-Gómez "Antimutagenicity of Xanthophylls presents in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene" *Mut. Res.* 389 (1997) 219-226.

GreenCanyon.com. Productos terapéuticos naturales. Lutein FloraGo. Producto natural a base de luteína de flor de cempasúchil. [www.greencanyon.com](http://www.greencanyon.com). México D. F. 2004.

Hadden W. L., R. H. Warkins, L. W. Levy, E. Regalado, D. M. Rivadeneira, R. B. van Breemen, S. J. Schwartz "Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement" *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4189-4194.

Handelman G. J., E. A. Dratz, C. C. Reay, F. J. G. M. van Kuijk "Carotenoids in the Human Macula and whole Retina" *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 29 (1988) 850-855.

Hanmoungjai P, D. L. Pyle, K. Niranjana. "Enzyme-assisted Water-extraction of Oil and Protein from Rice Bran" *J. Chem. Tech. Biotech.* 77 (2002) 771-776.

Hultén K., A. L. Van Kappel, A. Winkvist, R. Kaaks, G. Hallmans, P. Lenner, E. Riboli "Carotenoids, Alpha-tocopherols, and Retinol in Plasma and Breast Cancer Risk in Northern Sweden" *Cancer Causes Control* 12 (2001) 529-537.

Kimura M., D. B. Rodríguez-Amaya "A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids" *Food Chem.* 78 (2002) 389-398.

Kulkarni N, R.V. Grade. "Simple Gas Chromatography Method for Lipase Assay". *Biotechnol. Tech.* 12 (1998) 627-628.

Kuo T. M., H. W. Gardner (2002) "Lipid Biotechnology" 1 ed. Marcel Dekker Inc. New York.

Landrum J. T., R. A. Bone, H. Joa, M. D. Kilburn, L. L. Moore, K. E. Sprague "A One Year Study of the Macular Pigment: The Effect of 140 Days of a Lutein Supplement" *Exp. Eye Res.* 65 (1997) 57-62.

Landrum, J. T., R.A. Bone "Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment" *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (2001) 28-40.

Li H., Y. Jiang, F. Chen "Isolation and Purification of Lutein from the Microalga *Chlorella vulgaris* by Extraction after Saponification" *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1070-1072.

Martín-Garmendia M., A. Alonso, R. Gomez "Digestibility and Fate of Lutein in Chicken" *Comp. Biochem. Physiol.* 70A (1981) 619-621.

Martínez M. P., C. A. Cortés, G. E. Ávila "Evaluation of Three Pigment Levels of Marigold Petals (*Tagetes erecta*) on Skin Pigmentation of Broiler Chicken" *Tec. Pecu. Mex.* 42 (2004) 105-111.

McGraw K.J., M. D. Beebee, G. E. Hill, R. S. Parker "Lutein-based Plumage Coloration in Songbirds is a Consequence of Selective Pigment Incorporation into Feathers" *Comp. Biochem. Physiol.* B 135 (2003) 689-696.

Mora M. Tesis doctoral en curso "Hidrólisis de Ésteres de Luteína en Medios No Convencionales". UNAM. 2005. México D. F.

Mozaffarieh M., S. Sacu and A. Wedrich "The Role of the Carotenoids, Lutein and Zeaxanthin, in Protecting against Age-related Macular Degeneration: A Review based on Controversial Evidence" *J. Nutr.* 2 (2003) 1-8.

Nakagama H, S. Watanabe, S. Shimura, K. Kirimura, S. Usami. "Enzymatic Synthesis of Terpenyl Esters by Transesterification with Fatty Acid Vinyl Esters as Acyl Donors by *Trichosporon* Fermentans Lipase". *J. Microb. Biotech.* 14 (1998) 219-222.

Naranjo Mojad Sandra "Extracción de carotenoides y otros compuestos por medio de CO<sub>2</sub> en estado supercrítico a partir de *Tagetes erecta*" Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM. 2002. México D. F.

Nishino H., H. Tokuda, Y. Satomi, M. Masuda, P. Bu, M. Onozuka, S. Yamaguchi, Y. Okuda, J. Takayasu, J. Tsuruta, M. Okuda, E. Ichiishi, M. Murakoshi, T. Kato, N. Misawa, T. Narisawa, N. Nakasuka, M. Yano "Cancer Prevention by Carotenoids" *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2273-2278.

Nishino H., M. Murakoshi, T. Li, M. Takemura, M. Kuchide, M. Kanazawa, X. Yang Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Osaka, S. Yogosawa, Y. Satomi, K. Jinno "Carotenoids in Cancer Chemoprevention" *Cancer Metas. Rev.* 21 (2002) 257-264

Ohkubo M., M. Tsushima, T. Maoka, T. Matsuno "Carotenoids and their Metabolism in the Goldfish *Carassius auratus* (Hibuna)" *Comp. Biochem. Physiol.* 124B (1999) 333-340.

Pascal F., C. Dagot, H. Pingaud, J. P. Corriou, M. N. Pons, J. M. Engasser "Modeling of an Industrial Alcohol Fermentation and Simulation of the Plant by a Process Simulator" *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 202-217.

Peres C., M. D. R. Gomes Da Silva, S. Barreiros "Water Activity Effects on Geranyl Acetate Synthesis Catalyzed by Novozym in Supercritical Ethane and in Supercritical Carbon Dioxide" *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1884-1888.

Petrides D. P. BioPro Designer: "An Advanced Computing Environment for Modeling and Design of Integrated Biochemical Process" *Comp. Chem. Eng.* 18 (1994) S621-S625.

Petrides D. P., C. L. Cooney, L. B. Evans "Bioprocess Simulation: An Integrated Approach to Process Development" *Comp. Chem. Eng.* 13 (1989) 553-561.

Petrides D., K. G. Abeliotis, S. K. Mallick "EnviroCad: A Design Tool for Efficient Synthesis and Evaluation of Integrated Waste Recovery, Treatment and Disposal Processes" *Comp. Chem. Eng.* 18 (1994) S603-S607.

Petrides D. P. "BioPro Designer: An Advanced Computing Environment for Modeling and Design of Integrated Biochemical Processes" *Comp. Chem. Eng.* 18 (1994) S621-S625.

Petrides D. P., E. Sapidou, J. Calandranis "Computer-Aided Process Analysis and Economic Evaluation for Biosynthetic Human Insulin Production – A Case Study" *Biotech. Bioeng.* 48 (1995) 529-541.

Petrides D., A. Koulouris, P. T. Lagonikos "The Role of Process Simulation in Pharmaceutical Process Development and Product Commercialization" *Pharm. Eng.* January/February (2002/a) 56-65.

Petrides D., A. Koulouris, Ch. Siletti "Throughput Analysis and Debottlenecking of Biomanufacturing Facilities – A Job for Process Simulators" *BioPharm* 15 (2002/b) 28-64.

Philip T., T. Chen "Quantitative Analyses of Major Carotenoid Fatty Acid Esters in Fruits by Liquid Chromatography: Persimmon and Papaya" *J. Food Sci.* 53 (1988) 1743-1745.

Reddy S., D. Rautaray, S. R. Sainkar, M. Sastry "On the Morphology of SrCO<sub>3</sub> Crystals Grow at the Interface between Two Immiscible Liquids" *Bull. Mater. Sci.* 26 (2003) 283-288.

Riedl J., J. Linseisen, J. Hoffman, G. Wolfram "Some Dietary Fibers Reduce the Absorption of Carotenoids in Women" *J. Nutr.* 129 (1999) 2170-2176.

Rodríguez-Amaya D. B. (1999) "Carotenoides y Preparación de Alimentos" Universidad Estatal de Campinas, Brasil.

Roodenburg A. J. C., R. Leenen, K. H. van der Hof, J. A. Weststrate, B. M. Tijburg "Amount of Fat en the Diet affects Bioavailability of Lutein Esters but not of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and vitamin E in humans" *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1187-1193.

Rosenthal A., D. L. Pyle, K. Niranjana. "Aqueous and Enzymatic Process for Edible Oil Extraction" *Enz. Microb. Technol.* 19 (1996) 402-420.

Rouf, S. A., P.L. Douglas, M. Moo-Young, J. M. Scharer. "Computer Simulation for Large Scale Bioprocess Desing" *Biochem. Eng. J.* 8 (2001) 229-234.

SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Anuarios dinámicos de la producción agropecuaria en México. Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx). 2004. México D. F.

Schwartz S. J. "Pigments and Colorants" *Current Protol. Food Anal. Chem.* by John & Sonz, Inc. (2002) F.0.1 – F.0.2

Schalch W. "Possible Contribution of Lutein and Zeaxanthin, Carotenoids of the Macula Lutea, to Reducing the Risk of Age-related Macular Degeneration: a Review" *H. K. J. Ophthalmol.* 4 (2003) 31-42

Secundo F., G. Carrea "Lipase Activity and Conformation in Neat Organic Solvents" *J. Mol. Cat.* 19-20B (2002) 93-102.

Secundo F., G. Carrea, C. Soregaroli, D. Varinelli, R. Morrone. "Activity on Different *Candida antarctica* lipase B Formulations in Organic Solvents". *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001)157-163.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). Normas Oficiales Mexicanas. Subsecretaría de Fomento y Normatividad Ambiental. Normas Oficiales Mexicanas. [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx). México, D. F. 2004.

Shanklin T., K. Roper, P. K. Yegneswaran, M. R. Marten. "Selection of Bioprocess Simulation Software for Industrial Applications" *Biotechnol. Bioeng.* 72 (2001) 483-489.

Shin H; J. Kim, T. Kim, S. Kim, Y Lee "Esterification of Hydrophobic Substrates by Lipase in the Cyclodextrin induced Emulsion Reaction System" *Enz. Microb. Technol.* 30 (2002) 835-842.

Steffen E., O. A. Garro, S. Winkler, G. Venkataraman, R. Langer, C. L. Cooney, R. Sasisekharan. "Process Simulation for Recombinant Protein Production: Cost Estimation and Sensitivity Analysis for Heparinase I Expressed in *Escherichia coli*" *Biotechnol. Bioeng.* 53 (1997) 575-582.

Subagio A., N. Morita "No Effect of Esterification with Fatty Acid on Antioxidant Activity of Lutein" *Food Res. Int.* 34 (2001) 315-320.

Surai P.F., B. K. Speake, N. A. R. Wood, J. D. Blount, G. R. Bortolotti, N. H. C. Sparks "Carotenoids Discrimination by the Avian Embryo: a Lesson from Wild Birds" *Comp. Biochem. Physiol.* 128B (2001) 743-750

Urdike A. A. and S. J. Schwartz "Thermal Processing of Vegetables Increases Cis Isomers of Lutein and Zeaxanthin" *J. Agric. Food. Chem.* 51 (2003) 6184-6190.

Vasudevan P., Kashyap S., Satyawati S. "Tagetes: A Multipurpose Plant." *Biores. Technol.* 62 (1997) 29-35.

Wald G. "Human Vision and the Spectrum" *Science* 101 (1945) 653-658.

Wehtje E; D. Costes, P. Adlercreutz "Enantioselectivity of Lipases: Effects of Actions Water Activity" *J Mol. Catal.* 3B (1997) 221-230.

Winderath T., H. Stes, W. Stahl "Xanthophyll Esters in Human Skin" *Arch. Biochem. Biophys.* 355 (1999) 271-274.

Zhou, Y. H., I. L. J. Holwill, N. J. Titchener-Hooker "A study of the Use of Computer Simulations for the Design of Integrated Downstream Process" *Bioproc. Eng.* 16 (1997) 367-374.

Yadav, G. D, A. H. Triverdi. "Kinetic Modeling of Immobilized-lipase Catalyzed Transesterification of n-Octanol with Vinyl Acetate in Non-aqueous Media". *Enz. Microb. Technol.* 32 (2003) 783-789

Zorn H., D. E. Breithaupt, M. Takenberg, W. Schwack, R. G. Berger "Enzymatic Hydrolysis of Carotenoids Esters of Marigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) And red paprika (*Capsicum annum* L.) by Commercial Lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase" *Enz. Microb. Technol.* 6268 (2003) 1-6.

## ANEXO 1

### **Descripción del proceso tradicional para la obtención de harina de cempasúchil**

El proceso de elaboración de la harina de cempasúchil en México se lleva a cabo de la siguiente forma:

La obtención del cempasúchil para consumo de la harinera está basada en un contrato con los campesinos de la región, en el cual se les ofrece semilla y asesoramiento técnico gratuito así como la compra total de la cosecha a cambio del cultivo de la flor. De esta forma se asegura el suministro de la materia prima a la fábrica y al mismo tiempo, se reducen los costos de transportación, ya que la flor es sembrada en terrenos cercanos a la propia planta deshidratadora.

Una vez logrado el contrato, se lleva a cabo el cultivo llamado almácigo, que consiste en la siembra de la semilla en un espacio reducido (tipo invernadero). Esta operación dura de 25 a 35 días, en los cuales se verifica el crecimiento de la planta, para ser luego transplantada al área final de cultivo. A las 9 o 10 semanas después de ser transportada la flor, se realiza el ensayo de la cosecha (calentón), en la que cortan los primeros botones abiertos de las plantas con el objeto de que florezcan las demás. A lo largo del tiempo de vida de la flor se llevan a cabo 5 o 6 cortes con un periodo de 12 a 15 días entre uno y otro.

El corte y recolección de la flor se lleva a cabo manualmente, siendo transportada en camiones de redilas para ser entregada a pie de fábrica. Estas actividades están basadas en la programación que hace el ingeniero de campo, de tal forma que siempre haya un buen abastecimiento y no se produzcan cuellos de botella o pérdidas de material por exceso de materia prima. Tabla A1.

Se producen 25 000 toneladas de flor fresca por año para el consumo de una fábrica harinera promedio.

Tabla A1. Rendimiento promedio de flor por hectárea (Casarrubias y Hernández, 1996).

Corte	Toneladas
Ensayo	0.2
Primer	2.0
Segundo	3.0
Tercer	3.0
Cuarto	2.0
Quinto	1.8
Total	12.8

### **A1.1 Operaciones de proceso.**

#### **A1.1.1 Ensilado.**

Esta operación comienza en el momento que es entregada la flor, para lo cual se levantan muros de concreto preformado de 2 a 2.5 metros de altura, donde la superficie del silo dependerá de la materia prima que llegue del campo. El ensilado consiste en la compactación y descomposición anaerobia de la flor con el fin de romper las paredes celulares del tejido de los pétalos eliminándose una cantidad sustancial de agua del tipo ligado. Se debe tener cuidado al ensilar ya que no deben existir espacios vacíos entre las flores, lo que generaría una oxidación y una disminución en la calidad de la harina (disminuye la cantidad de caroteno). Por lo tanto, los silos deben estar tapados. En el ensilado, la flor es mantenida a una temperatura de 35 °C aproximadamente por un periodo de 15 días.

#### **A1.1.2 Prensado.**

Después de los 15 días que dura el ensilado, la flor es pasada al prensado mecánico por medio de una prensa sin fin y que tiene por objeto eliminar agua residual.

### **A1.1.3 Molienda.**

De la prensa se obtiene una materia prima en forma de terrones, lo que obliga a que se realice la operación de molienda con el fin de homogenizarla antes del secado.

### **A 1.1.4 Secado.**

Una vez picada, la flor se transporta por medio de trascabos al sitio de secado, donde existen 10 celdas de secado con dimensiones de 6 por 6 metros cada una y con una malla por donde se hace circular aire caliente a una temperatura de 65 °C con flujo perpendicular. El aire es calentado al pasar por un quemador de gas LP.

El secado se efectúa por convección y se realiza formando una cama de flor de 40 cm de espesor, lo cual es atravesada por el aire caliente; dicha cama es volteada cada hora y media. El tiempo total de secado es de 12 a 14 horas. La flor entra con 25 a 30% de humedad (en base húmeda) y sale con una humedad entre 5 y 10% (en base húmeda). Se producen aproximadamente 3 toneladas de harina por cada celda.

### **A 1.1.5 Empacado.**

La harina es empacada en bolsas negras de 25 kg debido a que el pigmento sufre degradación por la luz. Bajo las condiciones de operación descritas anteriormente la harina tiene una duración de almacenamiento de un mes aproximadamente si se mantiene en lugares secos y con temperatura templada.

**A1.2 Diagrama de flujo de proceso.**

La figura A1 presenta el diagrama de flujo del proceso descrito en el inciso anterior incluyendo un balance de masa que toma como base el procesamiento de 1000 toneladas de flor fresca por día.

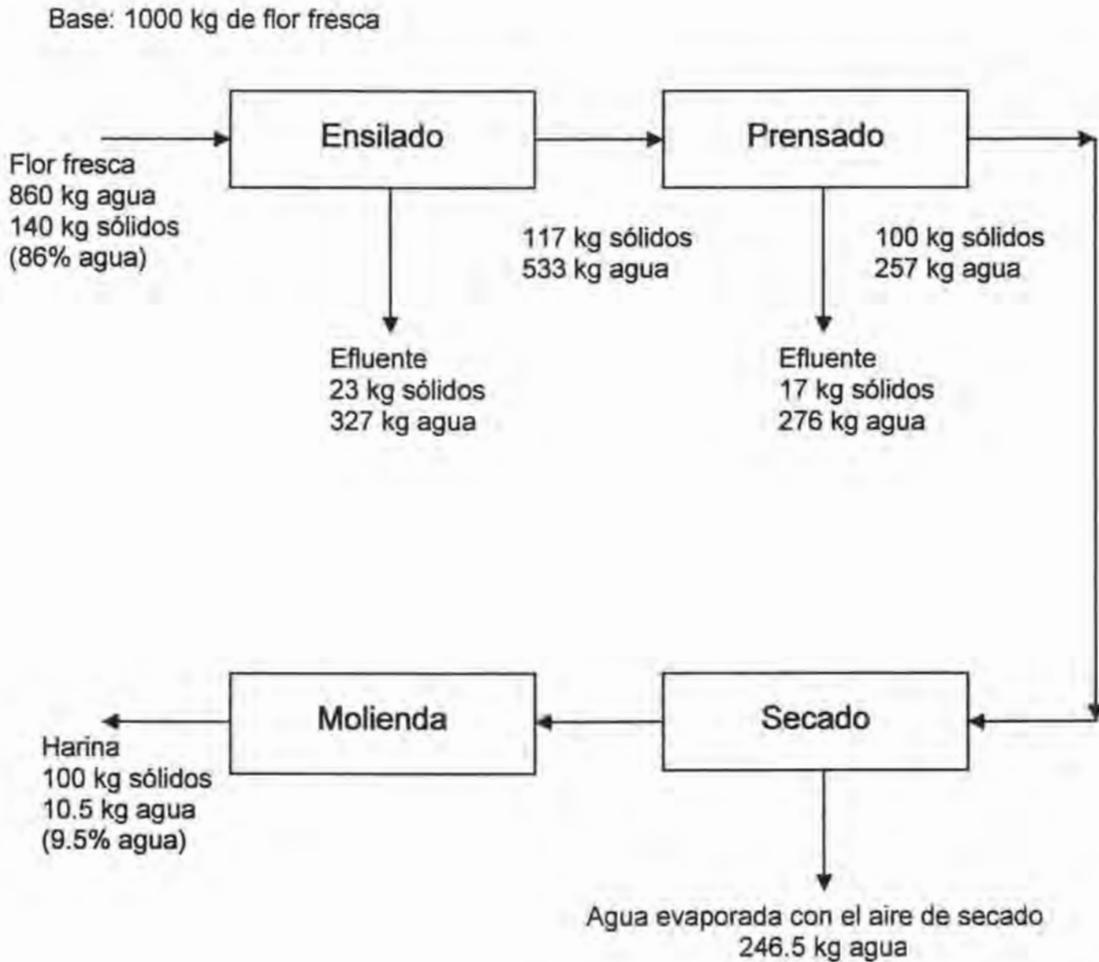


Figura A1. Diagrama de bloques y balances de masa para una planta deshidratadora de cempasúchil en México (Casarrubias y Hernández, 1996).

## ANEXO 2

Calculo de la  $K_{cat}$  para la hidrólisis de los diésteres de luteína.

Datos experimentales.

Tabla A2. Cuantificación de las especies de la reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* y la lipasa de *Mucor miehei*.

Tiempo (h)	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>				Lipasa de <i>Mucor miehei</i>			
	Luteína (µg/mL)	Monoéster (µg/mL)	Diéster (µg/mL)	Total (µg/mL)	Luteína (µg/mL)	Monoéster (µg/mL)	Diéster (µg/mL)	Total (µg/mL)
0	0.0	2.08	81.92	84.00	0.0	2.20	79.63	81.83
2	-	-	-	-	0.98	4.57	72.15	77.70
4	-	-	-	-	1.70	7.35	69.66	78.71
6	-	-	-	-	2.28	8.84	65.13	76.25
8	-	-	-	-	3.18	10.40	64.07	77.65
24	2.27	14.80	58.09	75.16	8.02	14.27	49.56	71.85
48	3.37	17.34	52.33	73.04	16.68	15.88	38.81	71.37
72	3.95	19.22	49.40	72.57	24.26	15.67	32.82	72.75
96	5.97	23.87	43.97	73.81	29.69	14.61	26.42	70.72
120	6.25	24.50	41.28	72.03	-	-	-	-
168	10.01	28.93	30.12	69.06	46.35	14.28	17.13	77.76

Fuente: Mora M. Estudios de doctorado. Comunicación Personal.

### Procedimiento para calcular la velocidad de reacción ( $k_{cat}$ ).

1.- Obtener los datos experimentales (Tabla A2).

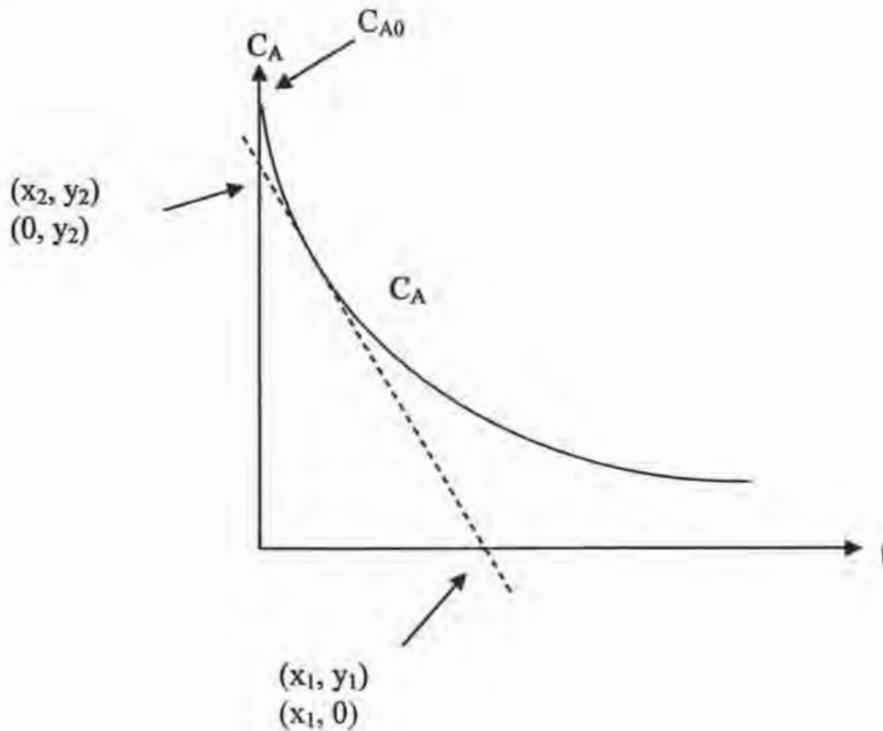
- La velocidad de reacción se calcula, a partir de los datos de cambio de concentración con el tiempo.

2.- Calcular la velocidad de reacción.

Para una reacción por lote:

$$(-r_A) = \frac{dC_A}{dt}, \text{ para } V=V_0$$

Para este ejercicio, se realizó un ajuste polinómico, utilizando un software llamado Polymath®.



A partir de los datos proporcionados por el grupo de trabajo del laboratorio, se obtuvo la velocidad de reacción, mediante un ajuste polinómico.

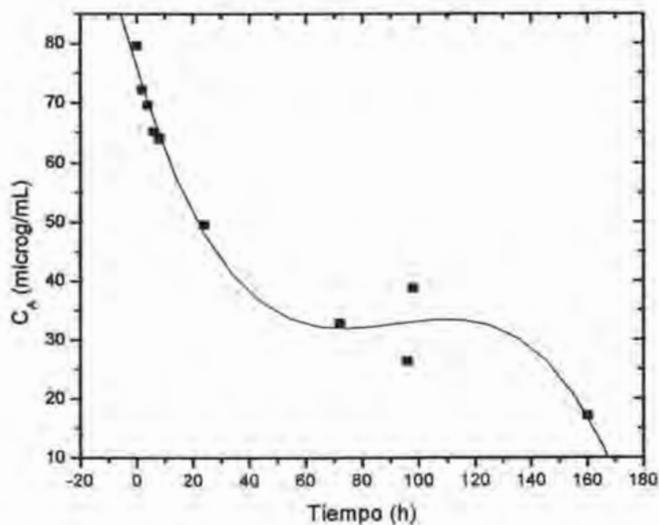


Figura A2. Ajuste polinómico de tercer orden usando el programa Origin®.

Obteniendo la siguiente ecuación, la cual se muestra en la Figura A3.

Results Log		
[05/05/2004 13:57 "/Graph1" (2453130)]		
Polynomial Regression for Data1_B:		
$Y = A + B1 * X + B2 * X^2 + B3 * X^3$		
Parameter	Value	Error
A	76.13555	2.33378
B1	-1.54064	0.28213
B2	0.01743	0.00465
B3	-6.31473E-5	1.87676E-5
R-Square (COD)	SD	N
0.97682	4.03592	10
		P
		<0.0001

Figura A3. Ventana que muestra los valores de las constantes de la ecuación de tercer orden obtenida del programa Origin®.

A partir de estos datos, se obtuvo la velocidad de reacción para cada punto, empleando Microsoft Excel. El cual se muestra en la Figura A4.

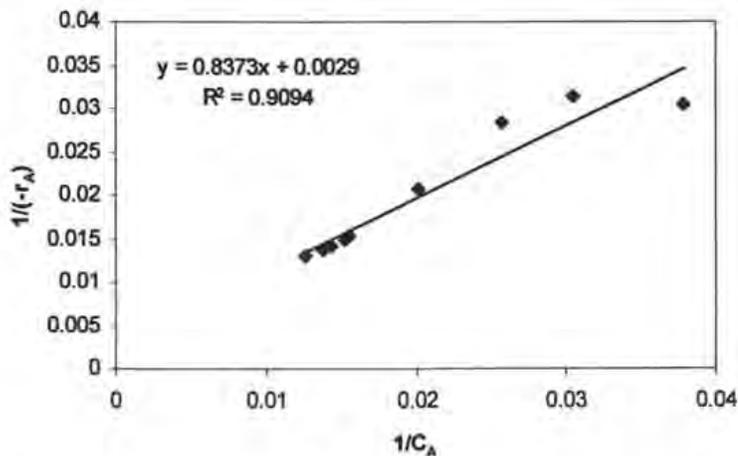


Figura A4. Gráfica que muestra la regresión lineal o de doble recíprocas, que se realizó para obtener las constantes:  $K_M$  y  $V_{max}$ .

**Ecuación de Lineweaver-Burk.**

$$\frac{1}{(-r_A)} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{C_A} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = 0.8373 \cdot x + 0.0029$$

por lo tanto  $V_{\max} = 344.827 \mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$

Si la  $[E_0] = 5 \text{ g/L}$

$$5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot \frac{1 \times 10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 5000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Si  $k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E_0]}$ , entonces

$$k_{\text{cat}} = \frac{344.827 \mu\text{g} / \text{mL} \cdot \text{h}}{5000 \mu\text{g} / \text{mL}} = 6.896 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$$

$$6.896 \times 10^{-2} \frac{1}{\text{h}} \cdot \frac{1 \text{ h}}{3600 \text{ s}}$$

por lo tanto:  $k_{\text{cat}} = 1.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

## ANEXO 3

### A3 Estandarización de un método para determinar actividad sintética de lipasas basada en cromatografía de gases.

#### A3.1 Introducción.

Contar con un método estándar rápido y confiable para medir la actividad enzimática de lipasas resulta de interés en laboratorios dedicados a la síntesis enzimática de compuestos con valor agregado.

La reacción que se eligió como referencia para medir dicha actividad fue la transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol para obtener acetato de butilo. Dicha reacción se presenta en la Figura A5.

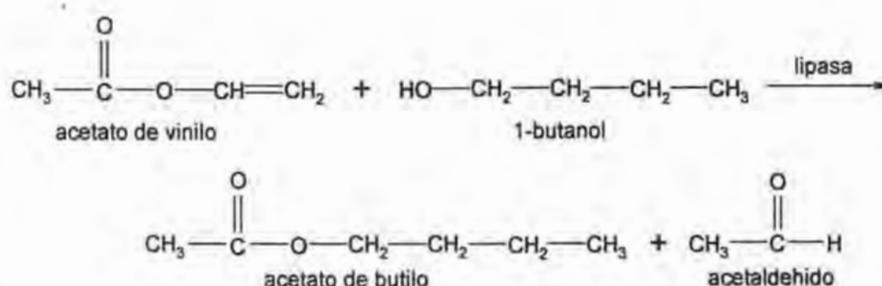


Figura A5. Reacción de transesterificación del acetato de vinilo y del 1-butanol.

#### A3.2 Materiales.

Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435), proporcionada por Novo Nordisk. El Acetato de vinilo y 1-butanol son de Sigma, el hexano es de Baker, los demás reactivos son de grado analítico.

### **A.3.3 Metodología.**

#### ***A3.3.1 Método experimental.***

En un matraz aforado, se agregan 0.5 mL de Acetato de vinilo (206 mM) y 0.3 mL de 1-Butanol (147mM) y se lleva a 25 mL con hexano. De este matraz, el contenido se vierte en dos matraces erlenmeyer con rosca en cantidades iguales, esto con el fin de tener un control, es decir un matraz sin enzima y otro el cual contendrá la lipasa. En el matraz con enzima se agregan 0.05g de biocatalizador, con lo que se inicia la reacción. Dicha reacción de transesterificación se lleva a cabo a 45 °C y a 210 RPM. A cada tiempo establecido se toma la cantidad de 0.5 mL, se vierte en un vial y se guarda en refrigeración.

#### ***A3.3.2 Método analítico:***

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II equipado con un detector de ionización de flama (DIF) y una columna HP-20M (C 20M) 25 m \* 0.32 mm \* 0.3 µm de espesor de película. La columna fue mantenida a 35 °C por tres minutos, programada a 85 °C a una velocidad de 10 °C/minuto. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 110 °C y 140 °C respectivamente. El nitrógeno fue el gas acarreador a un flujo de 27.3 mL/min.

Se inyectó 1 µL de cada una de las muestras y se graficó el cambio de concentración del acetato de butilo con respecto al tiempo y para calcular la actividad enzimática en tiempos cortos.

### A3.4 Resultados.

Inicialmente se determinó la curva estándar utilizando soluciones de diferentes concentraciones de acetato de vinilo (Figura A6).

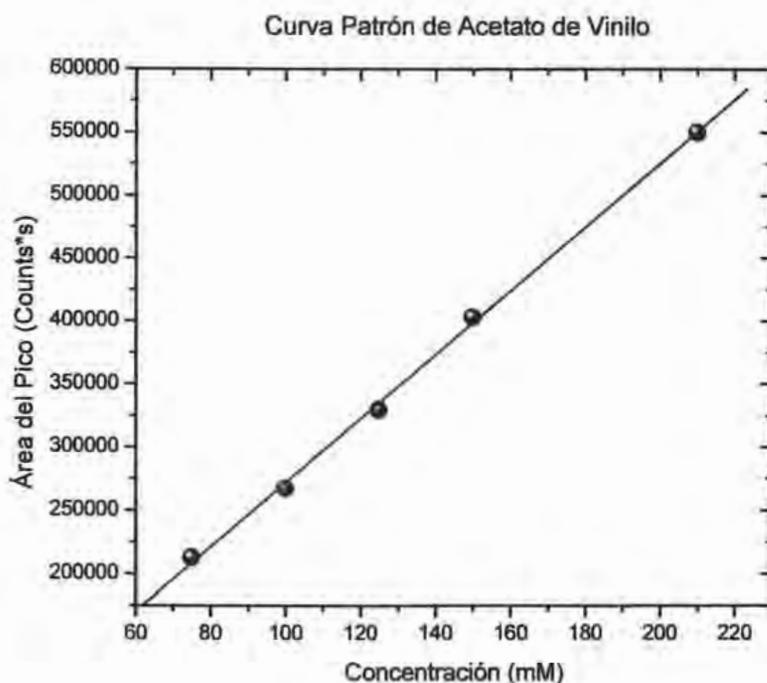


Figura A6. Curva patrón de acetato de vinilo

Obteniendo la siguiente ecuación:

$$y = 2532.5781x + 18211.89096$$

con una  $r = 0.99935$

Con base en resultados obtenidos anteriormente, se tomó la decisión de iniciar una reacción de 15 minutos, tomando muestras a los 2, 5, 10 y 15 minutos.

Se inyectaron las muestras al cromatógrafo de gases obteniéndose los siguientes cromatogramas (Figura A7):

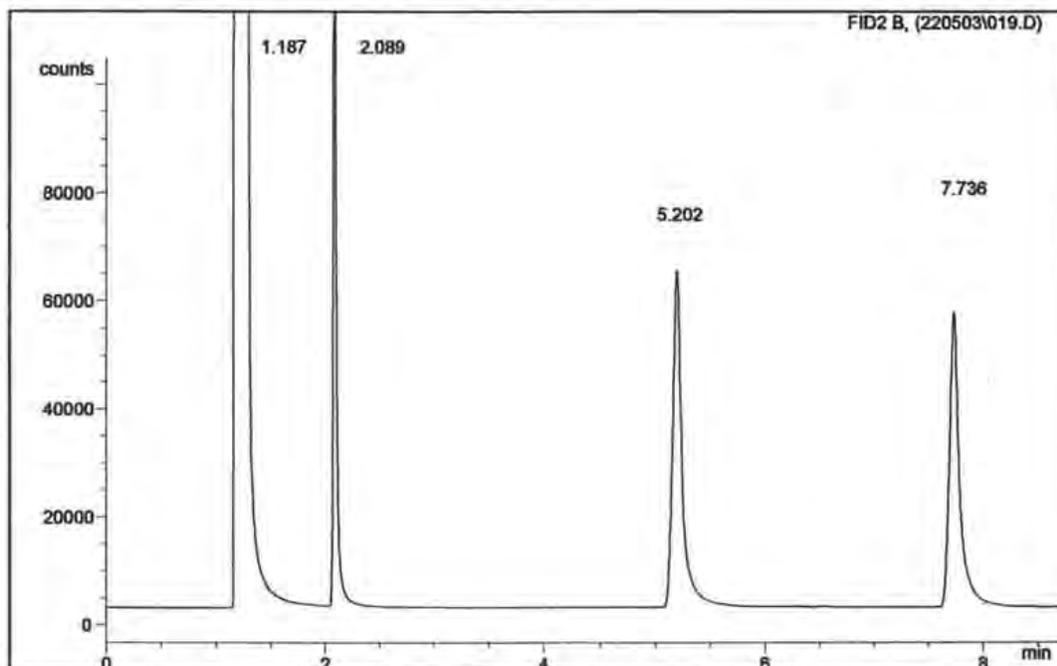


Figura A7. Cromatograma general que muestra los picos de tres de los cuatros compuestos que participan en la reacción así como el solvente (hexano).

El primer pico corresponde al solvente que es hexano, el segundo al acetato de vinilo que se está tomando como referencia para medir la actividad enzimática, el tercero es el acetato de butilo que es uno de los productos y el último pico es el 1-butanol.

Utilizando la curva estándar, se obtuvo una gráfica donde se muestra la desaparición del acetato de vinilo con el tiempo de reacción (Figura A8).

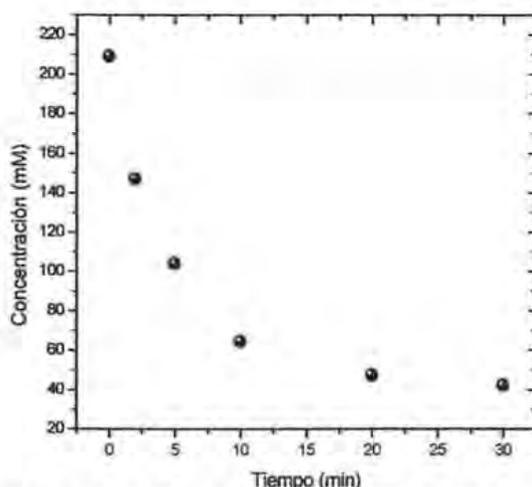


Figura A8. Cinética de desaparición del acetato de vinilo con respecto al tiempo de reacción.

#### A3.4.1 Actividad enzimática.

$$\text{Actividad} = \left( -\frac{ds}{dt} \right) \frac{1}{\text{mg de enzima}} = \frac{\text{velocidad inicial}}{\text{mg de enzima}}$$

La actividad se calculó a un tiempo de 10 minutos de reacción, se tomó como válido ese tiempo debido a que la concentración varía de manera ordenada y lineal hasta ese punto.

Dicho cálculo se realizó utilizando la pendiente obtenida de la regresión lineal de los primeros cuatro puntos, así como la cantidad de enzima agregada al sistema, por ende:

$$V_i = 13588.41 \frac{\mu\text{mol}}{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \times 12.5 \text{mL} \times \frac{1L}{1000\text{mL}} = 169.85 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$$

$$\text{Pendiente} = V_i = 13.58841 \mu\text{M}/\text{min} = 169.85 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$[E_0] = 50 \text{ mg}$$

$$\text{Actividad} = 3.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

Posteriormente se realizó una comparación con respecto a los datos recabados de la bibliografía comparándose con dos trabajos que presentaban reacciones similares (Tabla A3).

Tabla A3. Comparativo de la actividad obtenida con la reportada en la literatura especializada.

Autores	Sustratos	Enzima (mg)	Actividad ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
Yadav <i>et al.</i> (2003)	1000 mM n-octanol 1000 mM acetato de vinilo	25	11.3
Secundo <i>et al.</i> (2001)	190 mM 1-octanol 1100 mM acetato de vinilo	100	7.3
<b>Este trabajo</b>	206 mM butanol 147 mM acetato de vinilo	50	3.4

### A3.4.2 Eficiencia catalítica.

Una vez, calculada la actividad enzimática para la reacción de transesterificación, ahora se puede obtener la eficiencia catalítica de la enzima, para lo cual primero se hace una curva de saturación (ver Figura A9).

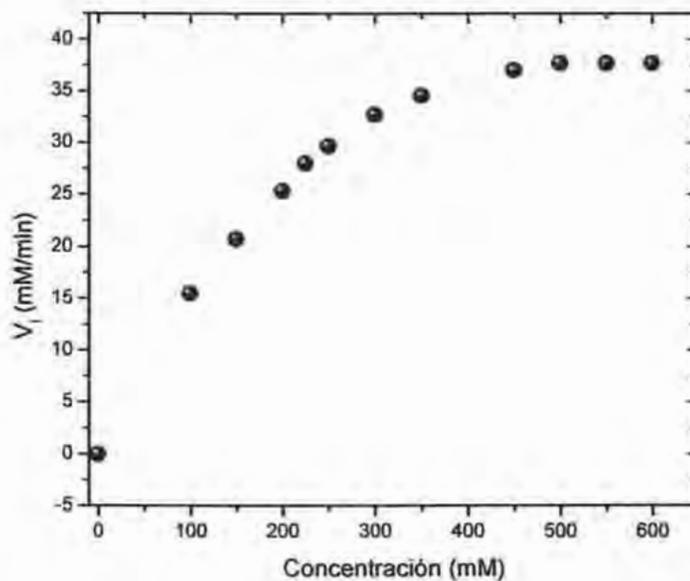


Figura A9. Curva de saturación del acetato de vinilo.

Como se puede observar, la enzima alcanza su saturación a una concentración de acetato de vinilo de 600 mM aproximadamente, donde la velocidad inicial de la reacción no sufre un cambio considerable.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de dicho modelo a partir de tres formas distintas:

## A3.4.2.1 Gráfica de Lineweaver-Burk.

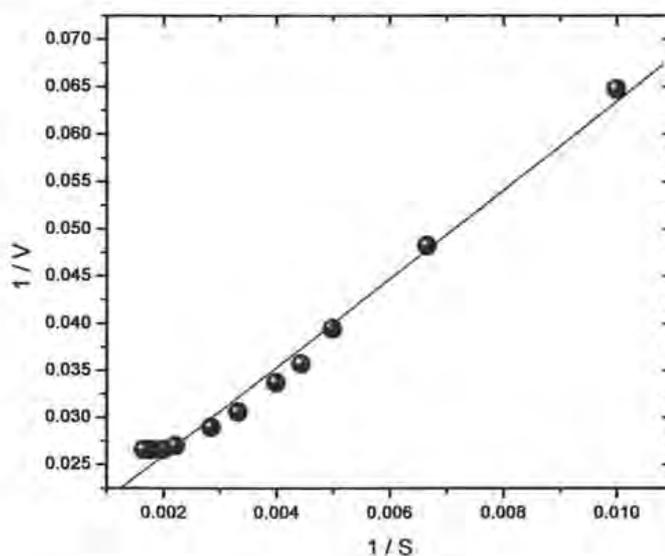


Figura A10. Gráfica de Lineweaver-Burk.

De la gráfica representada en la Figura A10 se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

donde:  $\frac{1}{V_{\max}} = 0.01652$   $V_{\max} = 60.53 \text{ mM/min}$

$\frac{K_M}{V_{\max}} = 4.68667$   $K_M = 284 \text{ mM}$

Con una  $r = 0.99354$

## A3.4.2.2 Gráfica de Eadie o Hanes.

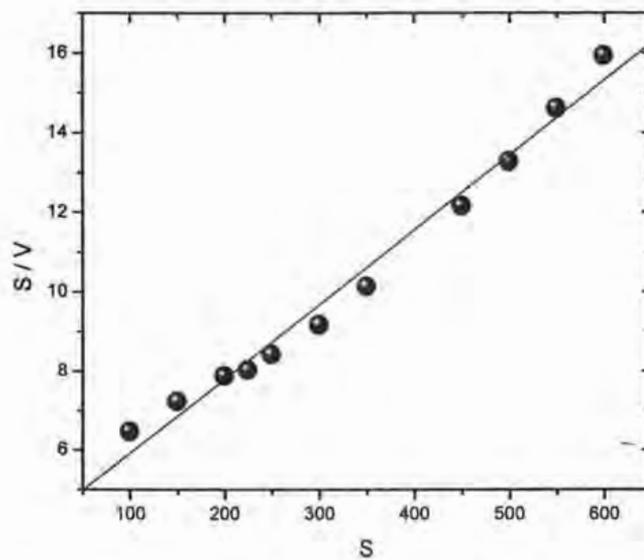


Figura A11. Gráfica de Eadie o Hanes.

De la gráfica representada en la Figura A11 se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{S}{V} = \frac{1}{V_{\max}} * S + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

donde:  $\frac{1}{V_{\max}} = 0.01878$

$$V_{\max} = 53.45 \text{ mM/min}$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} = 4.02817$$

$$K_M = 214.5 \text{ mM}$$

con una  $r = 0.99189$

## A3.4.2.3 Gráfica de Hofstee.

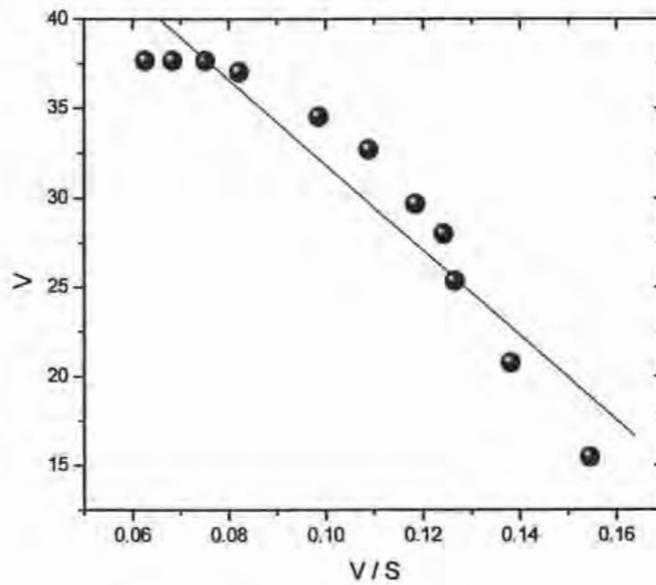


Figura A12. Gráfica de Hofstee.

De la gráfica representada en la Figura A12, se obtiene la siguiente ecuación:

$$V = -K_M * \frac{V}{S} + V_{\max}$$

donde:  $-K_M = -238.29$

$K_M = 238 \text{ mM}$

$V_{\max} = 55.7 \text{ mM/min}$

con una  $r = 0.95352$

A partir de los datos de  $V_{\max}$  obtenidos en los tres métodos, se obtuvieron los valores de  $k_{\text{cat}}$  utilizando la cantidad de enzima agregada al medio de reacción.

#### Lineweaver-Burk

$$V_{\max} = 60.53 \frac{\text{mM}}{\text{min}} * \frac{1\text{M}}{1000\text{M}} * 72.04 \frac{\text{g}}{\text{gmol}} * 12.5\text{mL} * \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} = 0.045 \frac{\text{g}}{\text{min}}$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{0.045 \frac{\text{g}}{\text{min}}}{0.05\text{g}} = 1.09 \text{ min}^{-1} = 1.8 * 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$$

Así, respectivamente para los otros dos métodos, de donde se obtiene la Tabla A4.

Tabla A4. Comparativo de las constantes cinéticas por tres diferentes métodos de arreglo de la ecuación de Michaelis-Menten.

<b>Lineweaver-Burk</b>	$K_M = 284 \text{ mM}$
	$K_{\text{cat}} = 1.8 * 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
<b>Eadie ó Hanes</b>	$K_M = 214.5 \text{ mM}$
	$K_{\text{cat}} = 1.6 * 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
<b>Hofstee</b>	$K_M = 238 \text{ mM}$
	$K_{\text{cat}} = 1.7 * 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

## ANEXO 4.

## PROCESO DE PURIFICACION DE LUTEÍNA

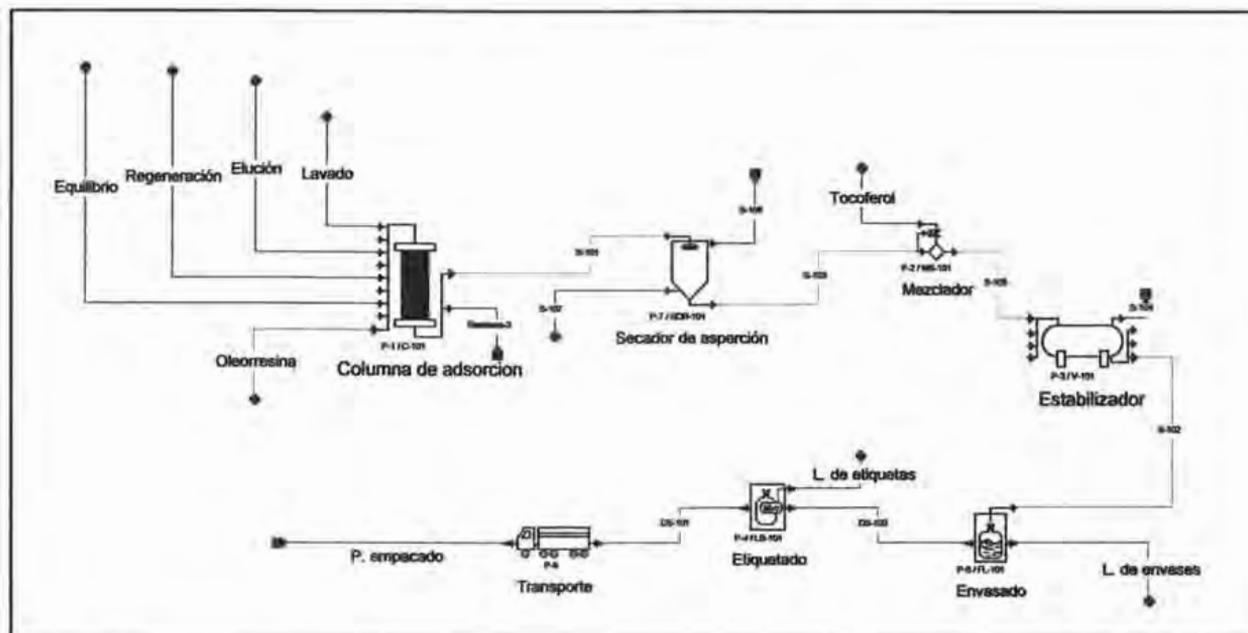


Figura A13. Diagrama del proceso de purificación utilizando el SPD.

#### A4.1 Descripción del proceso.

La oleoresina se hace pasar por una columna de adsorción la cual está empacada con carbón activado, con el nombre comercial de "Hyflosupercel<sup>®</sup>". Una vez que la materia prima está en la columna se usa una mezcla de éter etílico al 8% en éter de petróleo, esto con el fin de separar las grasas incluyendo al ácido palmítico, los cuales están presentes en el material oleoso.

Mientras las impurezas salen de la columna, las xantofilas se quedan retenidas en la fase estacionaria. Después se cambia la composición de la fase móvil por una solución de acetona al 30% en éter de petróleo para eluir a los carotenoides de la columna; la columna se lava con una solución de acetona al 70% en éter de petróleo por si llegaron a quedar algunas impurezas. Una vez finalizado el lavado,

se utiliza éter de petróleo para acondicionar la columna y dejarla lista para el siguiente lote (Kimura *et al.*, 2002).

El flujo principal pasa por un secador de aspersion, donde se separan los solventes, quedando un polvo amarillo con olor característico, con un pH en un rango de 8 a 12 y un tamaño de partícula de la malla #18.

El polvo, se mezcla con tocoferol como antioxidante, en una proporción al 0.25% con respecto a la cantidad de polvo de colorante total obtenida. Esta mezcla contiene residuos de solvente máximo de 20 ppm, y de metales pesados de 10 ppm máximo.

Con respecto a la estabilidad, el producto se degrada 3% máximo en un año, bajo condiciones de almacenamiento recomendadas. Se comercializa en recipientes de plástico con 1.25 kilogramos del producto final. Se etiqueta el envase y se coloca en contenedores para su distribución.

#### **A4.2 Materiales.**

En la Figura A14, se muestra el balance de materiales para este proceso de purificación.



$$\Sigma \text{ entrada} = \Sigma \text{ salida} = 23185.67 \text{ kg/lote}$$

Figura A14. Balance de materiales general para el proceso de purificación (kg/31.87 horas).

Se propuso una base de producción de 500 kilogramos de oleorresina procesados por lote; así se llevó a cabo el diseño del proceso de purificación orientado al consumo humano. En la Tabla A5 se enlistan las materias primas y cantidades utilizadas de cada una por lote.

Tabla A5. Kilogramos de materia prima alimentados al proceso de purificación.

Materias Primas	kg/lote
Oleorresina	500.00
Tocoferol	0.08
Éter de petróleo	8100.22
Éter etílico	177.24
Acetona	3067.76

Como se puede apreciar en la tabla anterior, la materia prima que más se ocupa es el éter de petróleo, pues participa en todas las etapas de la separación de los

carotenoides de los demás compuestos incluidos en la oleorresina por cromatografía de adsorción.

#### **A4.3 Condiciones de operación.**

A continuación se describen las condiciones de operación de cada uno de los equipos involucrados en el proceso de purificación de luteína libre.

##### **A4.3.1 Columna de adsorción.**

Lo primero que se tiene que hacer es cargar la columna, primero con la fase estacionaria y éter de petróleo como la fase móvil inicial. Esto con el fin de separar a las xantofilas de los demás compuestos presentes en la oleorresina.

Una vez que la columna está cargada de la fase móvil se cambia por una mezcla de éter etílico al 8% en éter de petróleo. En esta fase, se separan los ácidos grasos unidos a la luteína, así como las demás grasas que se encuentran en la flor de cempasúchil.

Cuando las xantofilas están adsorbidas en la fase móvil de la columna, es necesario desorberlas, por lo que se vuelve a modificar la fase móvil, usando una solución de acetona al 30% en éter de petróleo, logrando remover a todas las xantofilas de la fase estacionaria.

Después de que las xantofilas salen de la columna, se tiene que asegurar que no quede nada en la columna, pues eso representaría pérdidas para el proceso. Por lo que de nueva cuenta se vuelve a modificar la fase móvil, ahora con una mezcla de acetona al 70% en éter de petróleo. Con esto se evitan las trazas de colorante, sobre todo de neoxantina, carotenoide que se encuentra en cantidad mínima en la

oleorresina. Sin embargo si al quedar retenida, puede considerarse contaminante de la columna. Finalmente se lava la columna con éter de petróleo puro para acondicionarla y dejarla lista para el siguiente lote.

#### **A4.3.2 Secador de aspersión.**

La fase móvil junto con el material de interés, entra al secador de aspersión. Se utiliza aire seco para remover los solventes que trae el flujo principal, obteniendo con esto un polvo color amarillo donde se encuentra la luteína con otras xantofilas; esto es con el fin de que sea de fácil aplicación para la elaboración de los medicamentos o como parte de complementos alimenticios para consumo humano.

#### **A4.3.3 Mezclador y acondicionador.**

Obtenido el polvo, se procede a su estabilización, esto es para que el compuesto de interés no sufra descomposición, por lo cual se agrega tocoferol (vitamina E) como antioxidante que protege del daño causado por la oxidación. Después pasa a un tanque cerrado, colocado en un lugar fresco para que no haya daño por calor ó luz, llamado tanque de acondicionamiento, donde es almacenado para su posterior envasado.

#### **A4.3.4 Envasado y embalaje.**

Cuando el producto sale del tanque de acondicionamiento, pasa al envasado. En este caso se tendrán recipientes de 1.25 kg elaborados con plástico, fabricados de tal manera que no deje pasar la luz hacia dentro del recipiente teniendo una

cobertura interior de aluminio. Estas pasan al área de etiquetado donde se les colocan los datos del producto final y los datos de la empresa.

Estos son puestos en un lugar seco, protegidos de la luz del sol y del aire. Son transportados por vía terrestre o área según sea el caso para su distribución en las compañías encargadas para su aplicación.

#### **A4.4 Simulaciones para el proceso de purificación.**

##### **A4.4.1 Tiempo de proceso.**

El simulador mostró el tiempo total del proceso de purificación. Se incluyeron los tiempos, de envase y etiquetado, para tener el tiempo total desde que la oleorresina entra a la columna de adsorción, hasta que está lista para su distribución y venta.

El tiempo de proceso es de 7920 horas/año, considerándose 407 lotes al año, con un tiempo por lote de 31.84 horas y un tiempo mínimo efectivo de 19.40 horas. La Figura A15 muestra los tiempos como los proporciona el SPD en el ambiente Windows para un solo lote y la Figura A16 muestra tres lotes tal como se llevarían a cabo en una planta industrial, evitando tener tiempos muertos.

En la Tabla A6 se presentan cada uno de los equipos con el tiempo de residencia del flujo principal.

Tabla A6. Tiempo de operación de cada equipo del proceso de purificación.

Equipo	Tiempo (h)
Columna de adsorción	19.40
Secador de aspersion	2.00
Mezclador	1.00
Acondicionador	4.00
Envasado	3.80
Etiquetado	3.00
<b>Total</b>	<b>31.89</b>

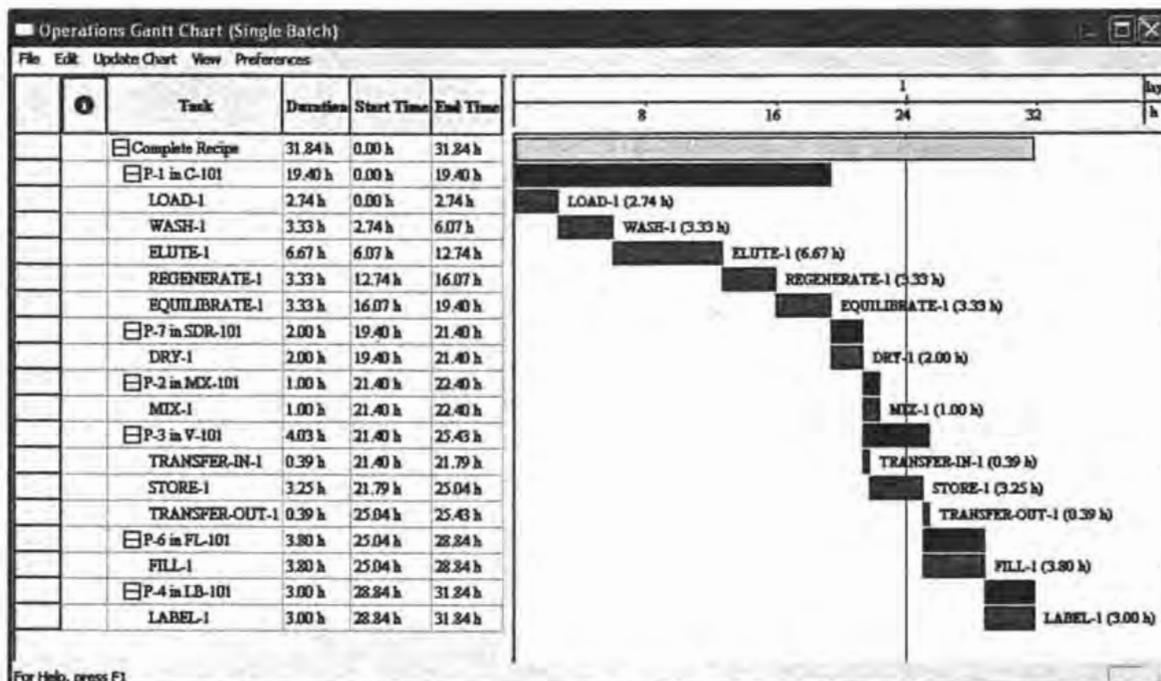


Figura A15. Gráfica de Gantt para un solo lote para el proceso de purificación, indicando los tiempos empleados para cada una de las operaciones unitarias.

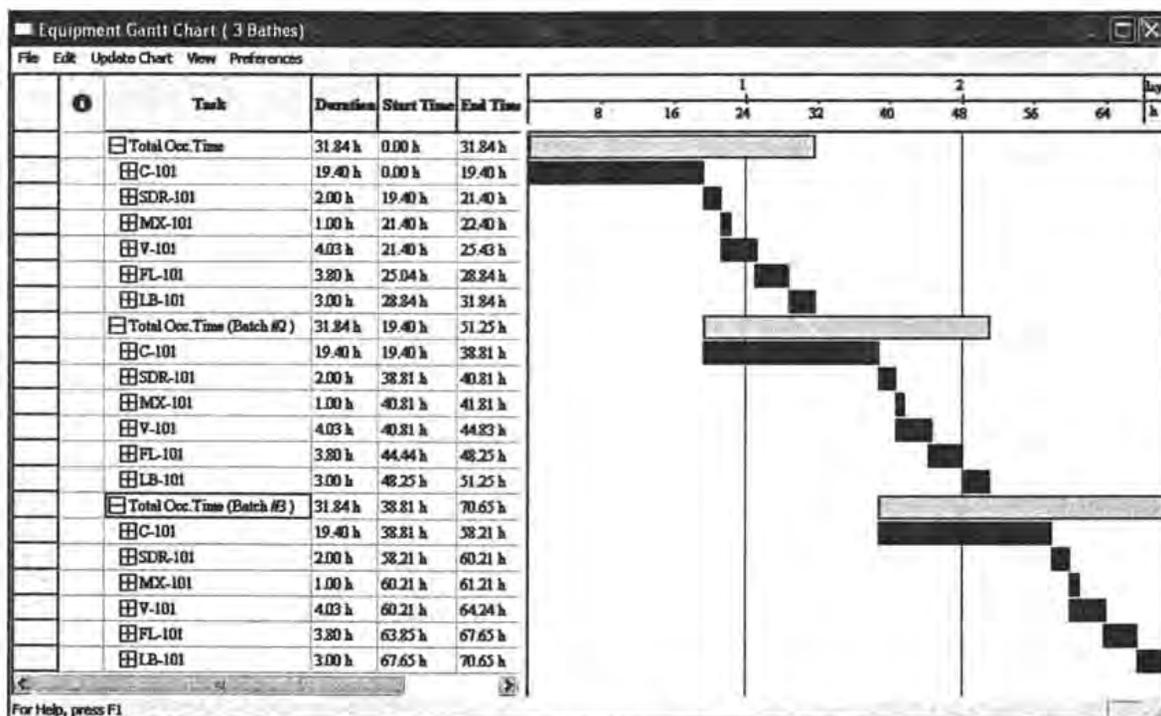


Figura A16. Gráfica de Gantt para varios lotes de acuerdo al proceso de purificación.

#### A4.4.2 Diseño de los equipos.

A partir del establecimiento de la base de producción que para este caso es de 500 kg de oleoresina por lote, el simulador hace el dimensionamiento de los equipos y con ello calcular el costo en base al material y al tamaño del equipo.

La Tabla A7 muestra las dimensiones o características físicas principales para cada uno de los equipos involucrados en el proceso de purificación. Esto incluye a las áreas de envasado y embalaje.

Tabla A7. Dimensionamiento de los equipos usados en el proceso de purificación.

Equipo	Característica	Valor
Columna de adsorción	Alto de la columna	5 m
	Diámetro de la columna	0.65 m
	Volumen de la columna	1642.57 L
Secador de aspersión	Diámetro	1.69 m
	Altura	5.07 m
Mezclador	Rendimiento nominal	32.93 kg/h
Envasador	Rendimiento nominal	10 envases/min
Etiquetador	Rendimiento nominal	10 envases/min

En este proceso, la columna de adsorción y el secador de aspersión son los equipos más grandes que se tienen en el proceso y también son los pasos limitantes en dicho proceso.

#### A4.4.3 Salida del proceso.

Una vez que se lleva a cabo la simulación ó el balance de materiales y energía, se puede evaluar el flujo de salida del proceso. En la Tabla A8 se muestran los flujos de salida de luteína y xantofilas. Estas se compararán con los resultados de rendimiento proporcionados por Bioquimex (comunicación personal). El simulador en este caso no arroja resultados en composición másica, si no que lo presenta en composición porcentual. Pero son fácilmente calculables ya que se tiene la cantidad de producto final que hay en cada recipiente (bolsa) después de salir del área de envasado y etiquetado.

Tabla A8. Composición de luteína y xantofilas (xantofilas totales sin luteína) en la salida para el proceso de purificación y comparación con lo reportado por Bioquimex.

Compuesto	Composición másica (%)	
	SPD	Bioquimex
Luteína libre	52.99	60.00
Éster de luteína	26.50	27.60
Xantofilas	20.27	12.16
Tocoferol	00.24	00.24
Total	100	100

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los resultados obtenidos por el simulador, son similares a los que reporta Bioquimex para su producto comercial "Xantopina® Plus", el cual es ideal para aplicaciones en suplementos nutricionales, nutraceuticos, alimentos funcionales y fortificados, es 100% biodegradable y no se estandariza con ningún otro vehiculo, según datos proporcionados por la misma empresa.

#### A4.5 Análisis económico.

Las materias primas que se utilizan en este proceso, se enlistan en la Tabla A9, así como las cantidades usadas por año y el monto gastado por cada materia prima en un año. Esto es con el fin de identificar que materia prima es determinante del proceso.

Tabla A9. Cantidad y costos anuales de la materia prima para el proceso de purificación.

<b>Materias Primas</b>	<b>\$/kg</b>	<b>Kg/año</b>	<b>\$/año</b>
Oleoresina	10.00	203 500.00	2,035,000.00
Éter de petróleo	0.20	3 296 791.86	659,358.00
Acetona	0.36	1 248 577.42	449,488.00
Éter etílico	0.39	72 136.25	28,133.00
Tocoferol	30	33.43	1,003.00
Envases (\$/pieza)	0.50	10 723.19	5,362.00
<b>Total</b>			<b>3,178,000.00</b>

Como se puede ver en la tabla anterior, el material que más costos genera es la oleoresina ya que representa más del 64% de los costos de la materia prima.

Los precios de los equipos que se emplean en este proceso se presentan en la Tabla A10. Este precio corresponde al proporcionado con el programa tal como lo reportan los distribuidores de equipos en Estados Unidos.

Como se puede apreciar en la siguiente tabla, el equipo con mayor costo es la columna de adsorción, ya que se tiene que tomar en cuenta, tanto el precio del equipo, como del material del cual está empacado, el cual se tiene que reemplazar cada determinado número de lotes.

Tabla A10. Precio de los equipos que se utilizan en el proceso de purificación.

Cantidad		Equipo	Costo por unidad (dólares)	Costo final (dólares)
1/0	C-101	Columna de adsorción	168,000.00	168,000.00
1/0	SDR-101	Secador de aspersion	137,000.00	137,000.00
1/0	MX-101	Mezclador	0	0
1/0	V-101	Tanque acondicionador	20,000.00	20,000.00
1/0	FL-101	Envasador	0	0
1/0	LB-102	Etiquetador	0	0
		Equipo no enlistado		81,000.00
		<b>Total</b>		<b>407,000.00</b>

El programa resume en tablas todos los datos detallados, pero para efectos de este trabajo sólo se mencionarán los más determinantes en la factibilidad del proceso. En la Tabla A11, se puede apreciar un resumen del capital fijo estimado para el proceso de purificación. Se toman en cuenta desde los precios de los equipos hasta las contingencias que se puedan presentar durante la construcción y/u operación de la planta.

Tabla A11. Resumen del capital fijo estimado para el proceso de purificación.

A. Costo directo total de la planta (CDTP) (Costos físicos)		
1. Costo de compra del equipo (CCE)	\$	407,000.00
2. Instalación	(0.51 × CCE)	128,000.00
3. Tuberías	(0.35 × CCE)	142,000.00
4. Instrumentación	(0.40 × CCE)	163,000.00
5. Aislamiento y pintado	(0.03 × CCE)	12,000.00

6. Eléctricos	(0.01 × CCE)	41,000.00
7. Edificaciones	(0.45 × CCE)	183,000.00
8. Apliación de la planta	(0.15 × CCE)	61,000.00
9. Servicios auxiliares	(0.40 × CCE)	163,000.00
	<b>CDTP =</b>	<b>1,299,000.00</b>
<b>B. Costo indirecto total de la planta (CITP)</b>		
10. Ingeniería	(0.25 × CDTP)	325,000.00
11. Construcción	(0.35 × CDTP)	454,000.00
	<b>CITP =</b>	<b>779,000.00</b>
<b>C. Costo total de la planta (CDTP + CITP)</b>		<b>CTP = 2,078,000.00</b>
12. Honorarios del contratista	(0.05 × CTP)	104,000.00
13. Contingencias	(0.10 × CTP)	208,000.00
	<b>(12+13) =</b>	<b>312,000.00</b>
<b>D. Capital fijo directo (CFD) CTP + 12 + 13</b>		<b>2,389,000.00</b>

El simulador también toma en cuenta el gasto de operación, que dependerá del área de la planta, del tiempo de operación de cada uno de los equipos en el lote, así como el número de personal asignado por cada área. La Tabla A12 enumera estos costos.

La Tabla A13 muestra los gastos por tipo y por sección de la planta, esto genera una perspectiva más amplia sobre que sección genera mayores costos y así poder mejorar el proceso de manera que se puedan disminuir los costos de producción, teniendo mayores ganancias.

Tabla A12. Resumen de costos de operación anual para el proceso de purificación.

Detalle de costo	\$/año
Materias primas	3,178,000.00
Dependiente de la mano de obra	595,000.00
Dependiente del equipo	451,000.00
Laboratorio	89,000.00
Transportación	1,000.00
Servicios	10,000.00
<b>Total</b>	<b>4,725,000.00</b>

Tabla A13. Desglose de los gastos por el tipo de costo y por sección de la planta para el proceso de purificación.

Costos	Separación	Secador	Estabilización	Empacado	Subtotal
	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año	\$/año
Materia prima	3,171,979.00	0	1,003.00	0	3,172,982.00
Equipo	220,661.00	200,242.00	29,748.00	0	450,651.00
Mano de obra	454,082.00	23,403.00	112,400.00	5,152.00	595,037.00
Consumibles	401,117.00	0	0	0	401,117.00
Laboratorio	68,112.00	3,510.00	16,860.00	773.00	89,255.00
Aguas residuales	0	0	0	0	0
Servicios	0	10,095.00	0	0	10,095.00
Transportación	0	0	0	671.00	671.00
Subtotal	4,315,952.00	237,250.00	160,010.00	6,596.00	4,719,808.00
Contribución (%)	91.44	5.03	3.39	0.14	100.00

A partir de los datos de la tabla anterior, se puede corroborar que el paso limitante técnica y económicamente, es el de la columna de adsorción, ya que es el que mayor tiempo de proceso establece y quien mayores gastos de producción genera. Para finalizar el análisis financiero, el simulador proporciona un análisis de factibilidad del proceso con los precios del 2005. (Tabla A14)

Tabla A14. Análisis de factibilidad para el proceso de purificación.

A. Capital fijo directo	\$	2,389,000.00
B. Capital trabajando		344,000.00
C. Costo de arranque		119,000.00
D. Pago de clasificación y diseño por adelantado		0
E. Pago de derechos por adelantado		0
F. Inversión total (A + B + C + D)		2,853,000.00
G. Inversión cargada a este proyecto		2,853,000.00
H. Ingreso de flujos piezas/año de luteína (en producto empacado)		10,723
I. Costo de producción por unidad \$/luteína (en producto empacado)		440.65
J. Precio de venta/procesamiento \$/luteína (en producto empacado)		600.00
K. Ganancias (\$/año) Producto empacado		6,434,000.00
L. Costo anual de operación		4,725,000.00
M. Perfil total (K-L)		1,709,000.00
N. Tasa (40%)		683,000.00
O. Perfil neto (M – N + Depreciación)		1,252,000.00
Margen total		<b>26.56 %</b>
Tasa de retorno		<b>43.89%</b>
Tiempo de recuperación de la inversión		<b>2.28 años</b>