



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

"EVALUACION DE DISOLVENTES EN LA REACCION ENZIMATICA
DE HIDROLISIS DE ESTERES DE LUTEÍNA"

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERIA

P R E S E N T A :

I. Q. JESSICA CLAUDIA GONZALEZ MEJIA

TUTOR:
DR. EDUARDO BARZANA GARCIA



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	6
3. HIPÓTESIS.....	7
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1 Características generales de los carotenoides.....	8
4.1.1 Características generales de la luteína.....	13
4.1.2 Papel de la luteína en la salud humana.....	17
4.1.2.1 La luteína en la salud del ojo.....	17
4.1.2.2 Degeneración Macular relativa a la Edad (AMD) y Cataratas.....	19
4.1.2.3 La luteína en la salud cardiovascular.....	20

4.1.2.4	La luteína y la salud de la piel.....	20
4.1.2.5	La luteína como un nutriente esencial.....	21
4.1.2.6	Absorción y depósito de luteína.....	21
4.1.2.7	Evaluación de seguridad.....	22
4.1.3	La luteína en la naturaleza.....	23
4.1.4	La flor de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>).....	24
4.1.4.1	Importancia comercial de <i>Tagetes erecta</i>	26
4.2	Generalidades de las lipasas.....	29
4.2.1	Aplicaciones industriales de las lipasas.....	30
4.2.1.1	Lipasas en síntesis orgánica.....	31
4.2.2	Estabilidad térmica de las lipasas.....	31
4.2.3	Actividad del agua (a_w) en las lipasas.....	32
4.2.4	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	34
4.2.5	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	37
4.3	Logaritmo del coeficiente de partición (log P).....	37
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	41
5.1	Enzimas.....	41
5.2	Sustrato.....	41
5.3	Materiales y reactivos.....	41
5.4	Equipo.....	42
5.5	Metodología.....	42
5.5.1	Ajuste del a_w	42
5.5.1.1	Ajuste del a_w del disolvente.....	43
5.5.1.2	Ajuste del a_w del biocatalizador.....	43
5.5.2	Procedimiento general de la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína.....	44

5.5.3	Análisis de muestras.....	44
5.5.3.1	Cromatografía en capa fina (TLC).....	44
5.5.3.2	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	44
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
6.1	Elección de disolventes orgánicos.....	46
6.2	Reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	47
6.2.1	Reacción en hexano.....	47
6.2.2	Reacción en disolventes con distintos valores de log P.....	50
6.2.3	Reacción en isooctano.....	54
6.3	Reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de <i>Candida antarctica</i>	59
6.3.1	Reacción en hexano.....	59
6.3.2	Reacción en disolventes con distintos valores de log P.....	60
6.3.3	Reacción en isooctano.....	62
7.	CONCLUSIONES.....	64
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Reacción enzimática de hidrólisis de ésteres de luteína.....	4
Figura 2	Estructura química de varios carotenoides.....	10
Figura 3	Espectro UV-visible de β -caroteno.....	11
Figura 4	Espectro UV-visible de licopeno.....	11
Figura 5	Espectro UV-visible de luteína.....	12
Figura 6	Espectro UV-visible de zeaxantina.....	12
Figura 7	Luteína libre, como se encuentra en vegetales.....	14
Figura 8	Luteína esterificada, como se encuentra en flores y frutas.....	14
Figura 9	Estructura de isómeros de luteína.....	16
Figura 10	Ojo humano mostrado en una estructura 3D.....	18
Figura 11	Estudio del ojo humano y la retina.....	19
Figura 12	Espectro de absorción de la luteína	23
Figura 13	Flor de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>).....	24
Figura 14	Cristales de luteína aislados de la flor de cempasúchil.....	25
Figura 15	Proceso de extracción de xantofilas a partir de la flor de cempasúchil.....	28
Figura 16	Mecanismo de la reacción de hidrólisis catalizada por <i>Candida antarctica</i>	36
Figura 17	Curva patrón de diésteres de luteína.....	45
Figura 18	Cromatograma del sustrato en hexano sin lipasa, t=0 horas ($a_w=0.153$).....	47
Figura 19	Cromatograma de reacción en hexano con la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> , $a_w = 0.153$ (después de 24 horas).....	47
Figura 20	Hidrólisis de los diésteres de luteína en hexano a varios valores de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (24 horas de reacción).....	48
Figura 21	Perfil de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> en hexano.....	49
Figura 22	Esquema de las muestras analizadas por TLC.....	50
Figura 23	Cromatograma del sustrato en isooctano sin lipasa, t=0 horas ($a_w=0.153$).....	54
Figura 24	Cromatograma de reacción en isooctano con la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> , $a_w = 0.153$ (después de 24 horas).....	54
Figura 25	Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (24 horas de reacción).....	55

Figura 26	Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (2 horas de reacción).....	56
Figura 27	Perfil de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> en isooctano.....	57
Figura 28	Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (concentración de saturación del sustrato).....	57
Figura 29	Hidrólisis de los diésteres de luteína en hexano a varios valores de a_w para la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (24 horas de reacción).....	59
Figura 30	Perfil de a_w para la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en hexano.....	60
Figura 31	Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (24 horas de reacción).....	62
Figura 32	Perfil de a_w para la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en isooctano.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Datos del espectro visible de varios carotenoides en dos disolventes.....	12
Tabla 2	Solubilidad relativa y absortividad de luteína en disolventes orgánicos.....	15
Tabla 3	Fuentes de luteína y zeaxantina.....	17
Tabla 4	Xantofilas presentes en la flor de cempasúchil como mezcla de ésteres de ácidos grasos.....	25
Tabla 5	Ácidos grasos encontrados como xantofilas en la flor de cempasúchil.....	26
Tabla 6	Campos de aplicación de las enzimas.....	29
Tabla 7	Máxima solubilidad de disolventes orgánicos en agua contra el valor de log P.....	38
Tabla 8	Valores de log P de los disolventes orgánicos usados comúnmente.....	39
Tabla 9	Variación del a_w en función de la temperatura de las sales usadas.....	43
Tabla 10	Propiedades de los disolventes empleados.....	46
Tabla 11	Rf de las especies presentes en las muestras.....	50
Tabla 12	Evaluación cualitativa de la reacción de hidrólisis en disolventes orgánicos para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> ($a_w \approx 0.1$).....	51
Tabla 13	Resultados obtenidos por HPLC para distintos disolventes durante la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> ($a_w \approx 0.1$, $t = 24$ h)	52
Tabla 14	Velocidad inicial de reacción para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> en distintos disolventes ($a_w \approx 0.1$).....	52
Tabla 15	μ moles de agua consumidas durante la reacción de hidrólisis para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> en isooctano (en función de a_w).....	58
Tabla 16	Resultados obtenidos por HPLC para distintos disolventes orgánicos durante la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> ($a_w \approx 0.1$, $t = 24$ h).....	61

Tabla 17	Velocidad inicial de reacción para la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en distintos disolventes ($a_w \approx 0.1$).....	61
----------	---	----

RESUMEN

Los carotenos son pigmentos ampliamente distribuidos en plantas y animales, y después de la clorofila, son los pigmentos más abundantes en la naturaleza. En particular, la luteína ha recibido especial atención por sus beneficios relacionados a la salud, tales como propiedades preventivas de enfermedades oculares, afecciones cardiovasculares y anti-cancerígenas.

Una de las fuentes industriales de luteína es la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), originaria de México. Su extracto (mezcla de diésteres de *trans*-luteína) ha sido usado por décadas como suplemento alimenticio en la industria de las aves de corral. El proceso industrial de producción de luteína incluye un paso de saponificación previo a la formulación del producto final. Las lipasas son una opción para reemplazar el uso de químicos alcalinos corrosivos, para catalizar esta reacción de hidrólisis, basado en su capacidad de reconocer una gran diversidad de ésteres.

En este trabajo, la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme 435) y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M) fueron evaluadas para la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína en diferentes disolventes (acetonitrilo, acetato de etilo, tolueno, ciclohexano, hexano, isooctano, decano y dodecano, con un valor de log P entre -0.33 y 6.6) en función de la actividad de agua (a_w). En todos los casos, a bajos valores de a_w se incrementó la velocidad de hidrólisis, obteniendo el mejor resultado para el isooctano (log P = 4.5). La conversión de los diésteres de luteína a luteína para la lipasa de *Rhizomucor miehei* a un $a_w \approx 0.1$ fue casi del 80% en isooctano, mientras que en hexano fue sólo del 30% después de 24 horas de reacción. Asimismo, la velocidad inicial es casi 7 veces mayor en isooctano que en hexano.

Los resultados obtenidos fueron inesperados para una reacción hidrolítica debido a que para ambas lipasas la mayor actividad enzimática fue observada a bajos valores de a_w . La razón puede deberse a que el proceso está controlado por una barrera molecular de agua la cual limita la interacción entre el sitio activo y el sustrato y es independiente de la clase de disolvente.

Por otro lado, se esperaba que los disolventes con mayores valores de log P promovieran la reacción de hidrólisis de los ésteres de luteína; sin embargo, el isooctano (log P = 4.5) mostró los mejores resultados de velocidad inicial y de conversión, lo cual no puede ser explicado considerando únicamente a log P como parámetro descriptivo de las propiedades del disolvente que afectan en forma determinante a la reacción enzimática.

ABSTRACT

Carotenes are pigments widely distributed in plants and animals and, after chlorophyll, are the most abundant pigments in nature. In particular, lutein has received special attention for its health related benefits, such as ocular diseases, anticancer and cardiovascular affection prevention properties.

One of the industrial sources of lutein is the marigold flower (*Tagetes erecta*) that is original from Mexico. Its extracts have been used as a mixture of all trans-lutein diesters for decades as feed supplements for the coloration of chicken skin and the egg yolk in the poultry industry. The industrial production process of lutein from marigold flower includes a saponification step previous to the final product formulation. Lipases are an attractive option to replace the use of alkaline corrosive chemicals to catalyze this hydrolytic reaction, based on their proved capacity to recognize a broad diversity of ester compounds.

In this work, lipase B from *Candida antarctica* (Novozyme 435) and lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M) were tested for the hydrolysis reaction of lutein esters in different solvents (acetonitrile, ethyl acetate, toluene, ciclohexane, hexane, isooctane, octane, decane and dodecane with log P values between -0.33 and 6.6) as a function of water activity (a_w). In all cases, low values of water activity enhanced the hydrolysis rate, obtaining the best results for isooctane (log P = 4.5). Conversion for the hydrolysis reaction of lutein diesters with *Rhizomucor miehei* at $a_w \approx 0.1$ was almost 80% in isooctane, while in hexane was only 30% after 24 h, showing an initial rate almost 7 times greater in isooctane than in hexane.

The results obtained were unexpected for a hydrolytic reaction because for both lipases the maximum enzyme activity was observed at low water activity values. The reason could be that the process is controlled by a molecular barrier of water which limits the interaction between the enzyme active site and the substrate and is independent of the kind of solvent.

In addition, it was expected that solvents with high log P values would promote the hydrolysis reaction of lutein esters. However, the isooctane (log P = 4.5) showed the best results for the initial rate and the conversion yield; this results can not be explained considering only log P values as a representative parameter that fully describes solvent effects on the enzymatic reaction.

1. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en plantas y animales, y después de la clorofila, son los pigmentos más abundantes en la naturaleza (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997). Se cree que la ingestión de carotenoides puede reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas incluyendo ciertas formas de cáncer, enfermedades del corazón, y ciertos tipos de enfermedades oculares; en particular, la luteína ha recibido especial atención por sus beneficios relacionados a la salud (Kritchevski, 1999).

La luteína (y su estereoisómero, la zeaxantina) están altamente concentradas en la mácula, una pequeña área de la retina responsable de la visión central y de la alta agudeza visual, y son los únicos carotenoides presentes en este tejido (Landrum y Bone, 2001). Conocida comúnmente por su importancia para la salud del ojo, el consumo y los niveles de luteína han demostrado estar relacionados inversamente con el riesgo de pérdida de la vista, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (Age-Related Macular Degeneration, AMD) y cataratas (Mares-Perlman et al., 2002).

El beneficio de la luteína en los seres humanos no se detiene con la salud del ojo. Recientes estudios sugieren que la luteína y la zeaxantina, pueden ayudar a mantener la salud del corazón, reduciendo el riesgo de arterosclerosis. La presencia de la luteína en la piel y su consumo oral tiene como resultado la reducción en el daño inducido por los rayos UV y puede ser importante para la salud de la piel (Gey, 1993).

En las plantas, la luteína funciona como un antioxidante y las protege del daño fotoinducido por radicales libres (Baroli y Niyogy, 2000). La luz azul es la forma de energía mas alta de la luz visible y se sabe que induce el daño foto-oxidativo mediante la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS).

Una de las fuentes industriales de luteína es la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), originaria de México. Su extracto (mezcla de diésteres de *trans*-luteína) obtenido con hexano como disolvente ha sido usado por décadas como suplemento alimenticio en la industria de aves de corral (para la coloración de la piel de pollos y la yema de huevo) (Alam et al., 1968).

El proceso industrial de producción de luteína incluye un paso de saponificación (generalmente con hidróxido de potasio) previo a la formulación del producto final. La saponificación se lleva a cabo durante la manufactura para incrementar el valor de la pigmentación del extracto ya que la forma no esterificada es asimilada con mayor eficiencia por las aves (Hadden et al., 1999). Las lipasas son una opción para catalizar la reacción de hidrólisis, con base en su capacidad de reconocer una gran diversidad de compuestos esterificados en un medio orgánico. Es por lo tanto de interés el llevar a cabo la desesterificación enzimática simultáneamente a la etapa de extracción con hexano.

La reacción de hidrólisis catalizada enzimáticamente para la desesterificación de los ésteres de luteína se muestra en la figura 1.

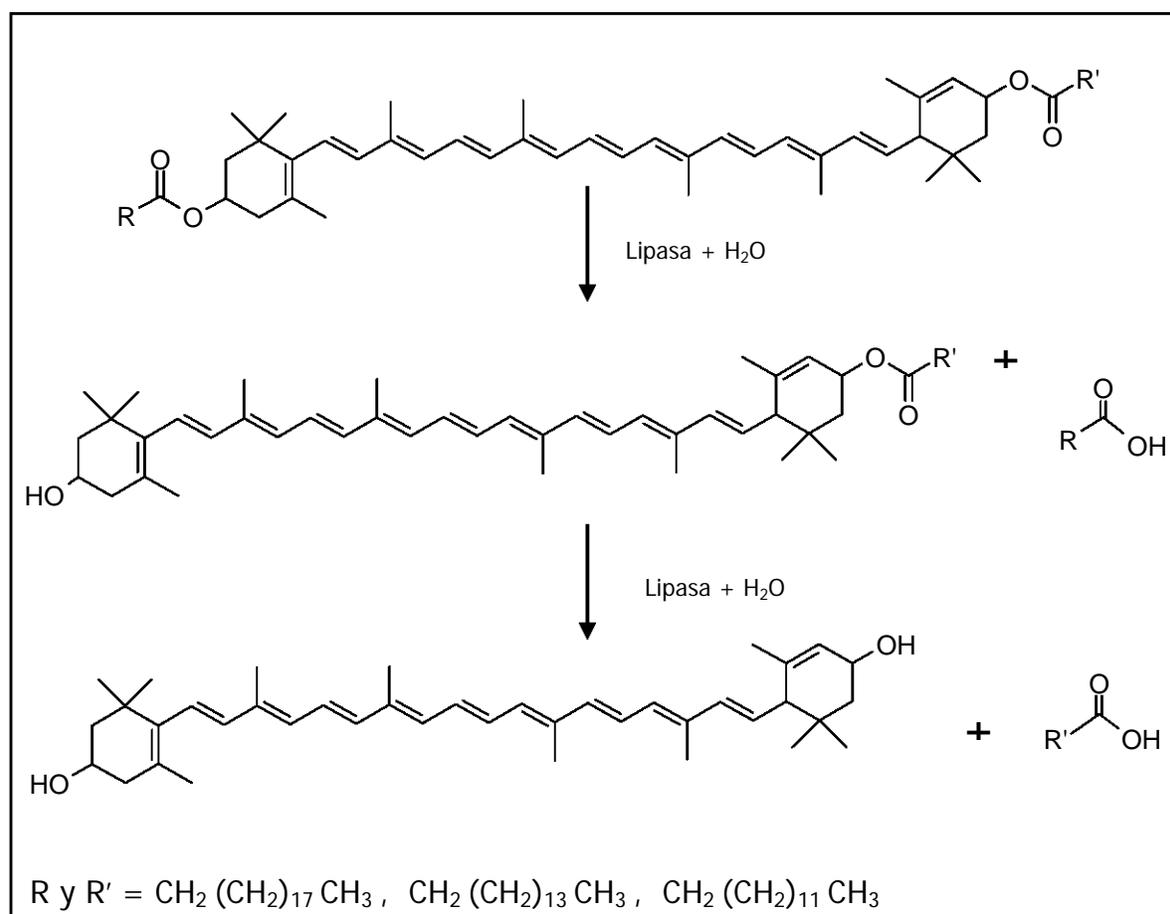


Figura 1. Reacción enzimática de hidrólisis de ésteres de luteína

Desde los primeros trabajos de Klibanov, en la década de los 80's, se sabe que todas las enzimas necesitan una pequeña cantidad de agua para mantener su actividad catalítica. Para el caso de las lipasas, el agua juega un papel adicional dependiendo de la clase de reacción que se lleve a cabo (Klibanov, 1986). El parámetro termodinámico conocido como actividad del agua (a_w) representa la cantidad de agua disponible para tales interacciones. Por su parte, las reacciones de hidrólisis están comúnmente favorecidas a altos valores de a_w mostrando un valor máximo de velocidad de reacción (Halling et al., 1992).

La selección del disolvente en reacciones enzimáticas en medios no acuosos es importante debido a que puede afectar la partición de sustratos y productos; sin embargo, el uso de tales disolventes es limitado porque pueden desactivar o desnaturalizar la enzima. La relación entre polaridad ($\log P$) y actividad catalítica compara la capacidad de los disolventes orgánicos para distorsionar la capa esencial de agua que estabiliza al biocatalizador (Laane et al., 1987).

La finalidad de este trabajo fue el caracterizar la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) y lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M) en varios disolventes (con un valor de $\log P$ entre -0.33 y 6.6) en función de la actividad del agua como parámetro crítico que afecta tanto la actividad enzimática como la disponibilidad del agua por ser sustrato de la reacción de hidrólisis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Conocer el efecto que tiene la polaridad de los disolventes orgánicos en la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína empleando las lipasas comerciales B de *Candida antarctica* (Novozym 435) y *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M).

2.2 Objetivos Particulares

- Determinar el perfil de reacción para cada enzima en función del disolvente caracterizado por su log P.
- Establecer la funcionalidad de la reacción con la actividad acuosa del sistema.
- Definir el mejor sistema para la conversión de diésteres de luteína en función del disolvente, del a_w y de la enzima.

3. HIPÓTESIS

- La hidrólisis con lipasas de diésteres de luteína en disolventes orgánicos se verá favorecida a altos valores de actividad acuosa; este efecto será más marcado en disolventes con un alto valor de log P (baja polaridad), permitiendo con ello la disponibilidad suficiente de agua para la estequiometría de la reacción y el nivel de hidratación enzimática adecuada para que exprese su actividad catalítica.

4. ANTECEDENTES

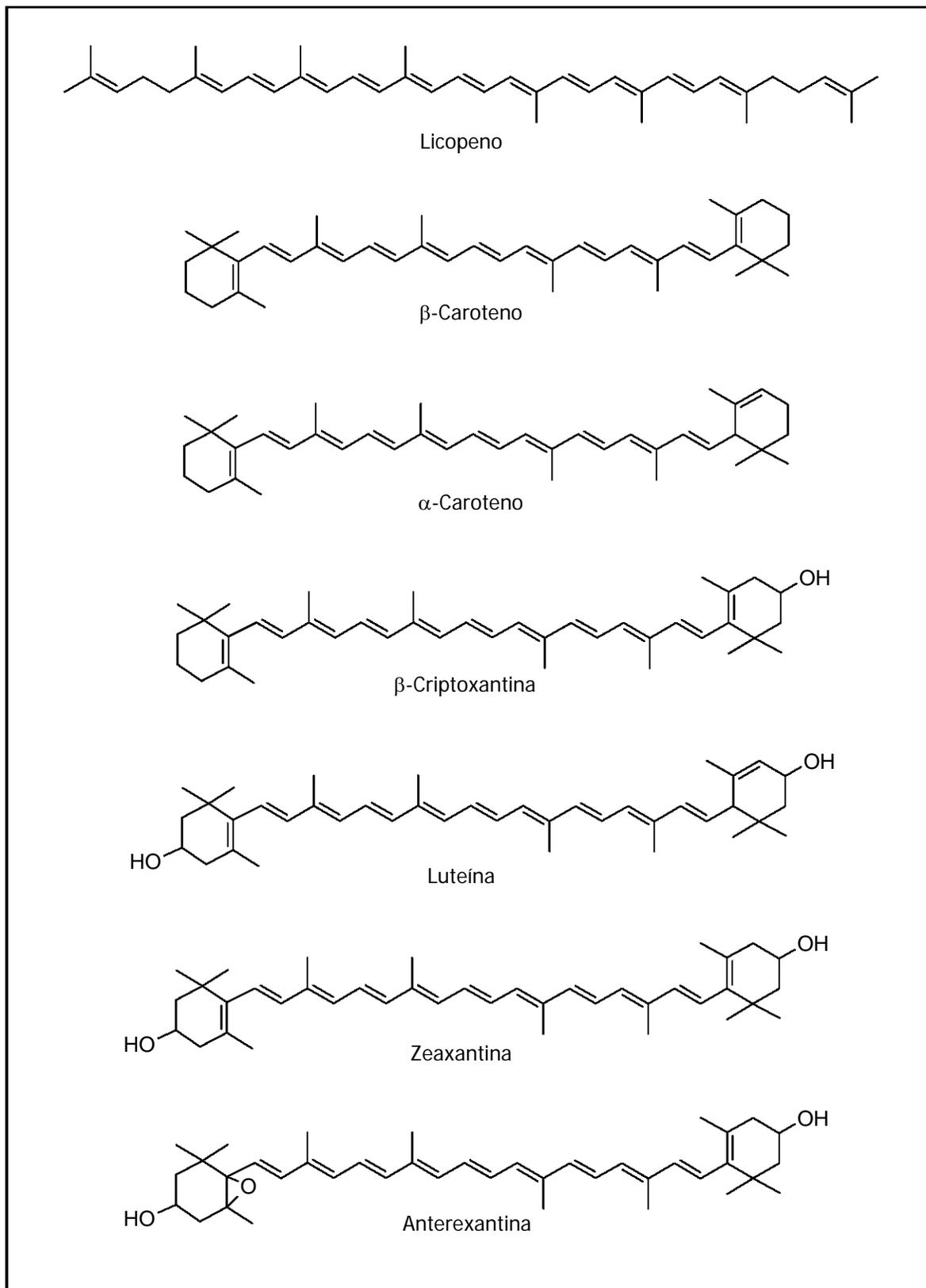
4.1 Características generales de los carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente de ocho unidades juntas de isopreno (C_5H_8). La mayoría son solubles en disolventes apolares y presentan coloraciones que oscilan entre amarillo y rojo. La brillantez del color de los carotenoides se debe al cromóforo de la molécula (cadena de dobles enlaces conjugados); una reducción en la conjugación produce formas amarillas, mientras una oxidación da formas rojas o incoloras (Tafoya y García Hernández, 1993).

Estos pigmentos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que la existencia de color en los organismos es un fenómeno relacionado con la adaptación al medio ambiente, por lo que se pueden encontrar asociados a mecanismos de protección, reproducción, transducción de energía, etc.

Se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos sólo contienen carbono e hidrógeno (β -caroteno, licopeno), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (luteína, zeaxantina); en los extremos de la molécula presentan grupos lineales o cíclicos, ciclohexano y ciclopentano. A los carotenoides generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de los anillos laterales, en especial la posición del doble enlace. En general, para los carotenos se usa el sufijo *eno* y para las xantofilas el sufijo *ina* (Oliver y Palou, 2000). En la figura 2 se muestra la estructura química de varios carotenoides.

Los carotenoides son básicamente no polares, propiedad que varía según la estructura química. Son, por ello, extraídos con disolventes orgánicos (libres de peróxidos para evitar oxidación) como éter, acetona, hexano, cloroformo, etc. (Davies, 1976). Los carotenos son en general menos polares que las xantofilas, debido a la incorporación de oxígeno en las estructuras de estas últimas.



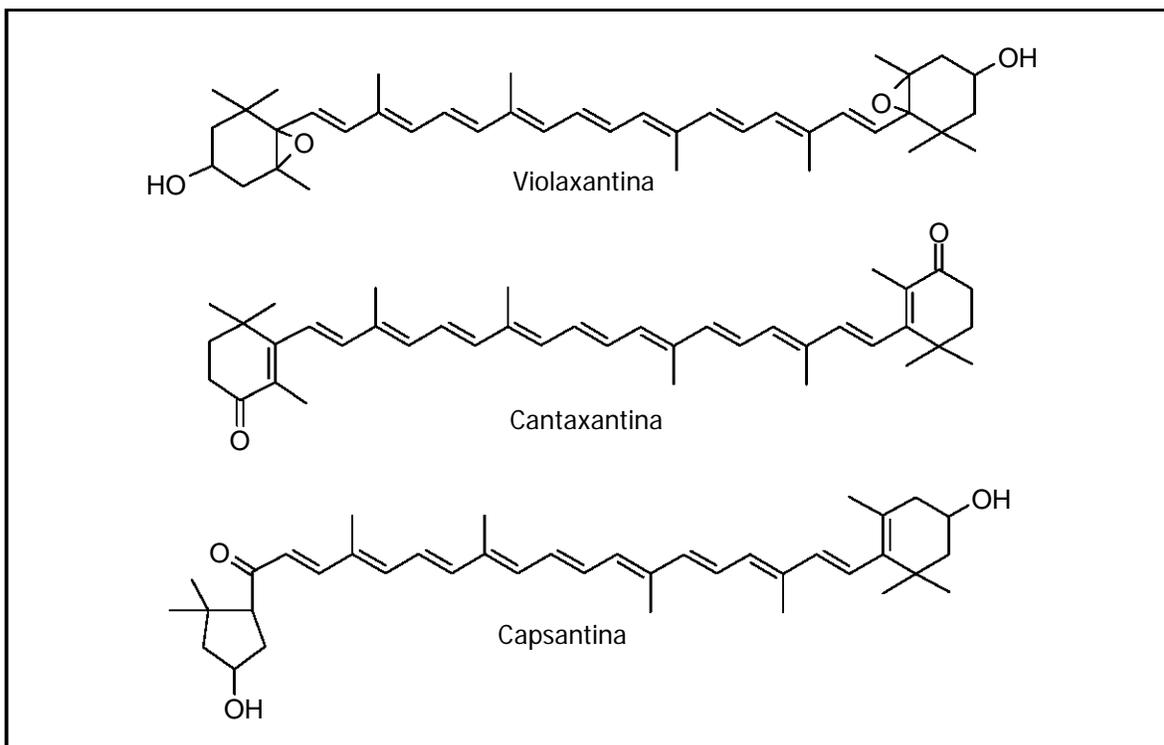


Figura 2. Estructura química de varios carotenoides (Oliver y Palou, 2000)

Debido a la alta conjugación de los enlaces dobles presentes en sus moléculas, los carotenoides pierden su poder cromóforo por la temperatura y el aire.

La luz favorece las reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo, isomerismo *cis* y *trans*), el calor favorece las reacciones térmicas de degradación, y el aire debido al oxígeno presente favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidróxilo y peróxido, entre otras. Por estas razones, la extracción de los carotenoides se debe realizar preferentemente en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor y en ausencia de oxígeno; la evaporación se debe realizar al vacío y/o bajo una corriente de nitrógeno y las muestras deben ser almacenadas en la oscuridad, bajo nitrógeno o argón a una temperatura cercana a los -20°C (Mercadante, 1998).

Los pasos requeridos para el estudio de los carotenoides son: extracción, separación, identificación y cuantificación. Los disolventes polares (tales como acetona, metanol y etanol) son buenos para la extracción de xantofilas pero no de carotenos. Como regla general, el proceso de

extracción consiste en la remoción de compuestos hidrofóbicos de un medio hidrofílico. Para el aislamiento de carotenos, es útil extraer las muestras primero con un disolvente altamente polar (por ejemplo, metanol) que remueve agua y las xantofilas parcialmente, después, los carotenos pueden ser extraídos con un disolvente de menor polaridad (Su et al., 2002).

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nm. Se observa un máximo alrededor de 450 nm y generalmente se aprecian dos picos u hombros a cada lado. Para analizar los carotenoides es importante considerar que sus espectros máximos de absorción varían de acuerdo al disolvente en el cual se disuelven; además proveen cambios adicionales debido a sus características, de polares a no polares. Las figuras 3 – 6 muestran los espectros visibles de varios carotenoides (Zang et al., 1997). La tabla 1 muestra los datos del espectro visible de algunos carotenoides, en n-hexano y en cloroformo.

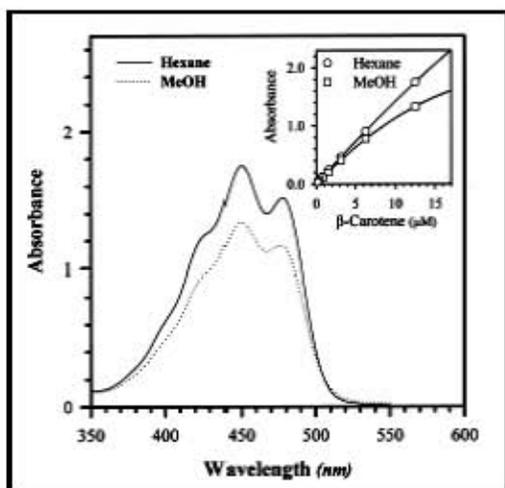


Figura 3. Espectro UV-visible de β -caroteno ($12.5\mu\text{M}$) en hexano (línea gruesa) y metanol (línea punteada) en presencia de $10\mu\text{g/mL}$ de BHT (Zang et al., 1997).

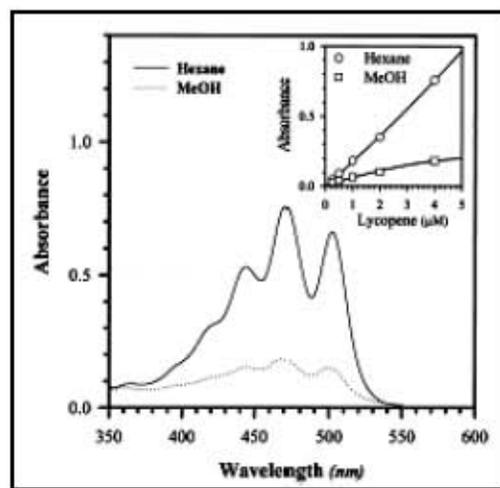


Figura 4. Espectro UV-visible de licopeno ($4\mu\text{M}$) en hexano (línea gruesa) y metanol (línea punteada) en presencia de $10\mu\text{g/mL}$ de BHT (Zang et al., 1997).

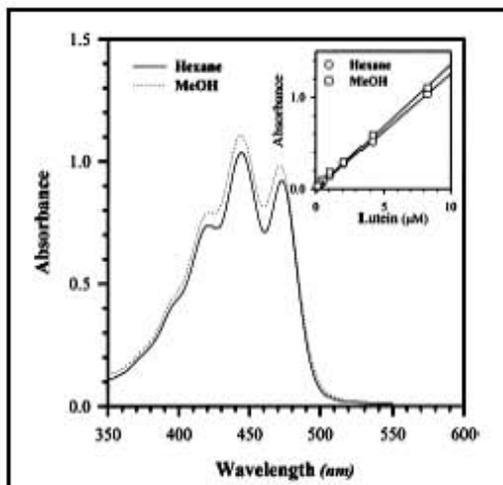


Figura 5. Espectro UV-visible de luteína (7 μ M) en hexano (línea gruesa) y metanol (línea punteada) en presencia de 10 μ g/mL de BHT (Zang et al., 1997).

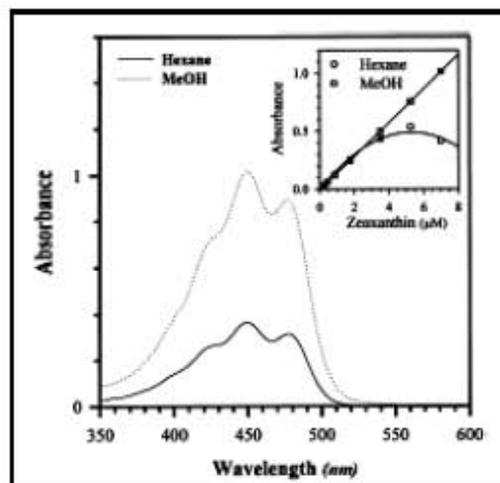


Figura 6. Espectro UV-visible de zeaxantina (7 μ M) en hexano (línea gruesa) y metanol (línea punteada) en presencia de 10 μ g/mL de BHT (Zang et al., 1997).

Tabla 1. Datos del espectro visible de varios carotenoides en dos disolventes (Mercadante, 1998)

Pigmento	MÁXIMOS DE ABSORCIÓN (nm)	
	n-Hexano o Éter de Petróleo	Cloroformo
α -caroteno	422, 444, 473	454, 485
β -caroteno	425h, 451, 482	466, 497
γ -caroteno	437, 462, 494	447, 475, 508
ϵ -caroteno	419, 444, 475	418, 442, 471 (Etanol)
Licopeno	446, 472, 505	456, 485, 520
Luteína	420, 447, 477	428, 456, 487
Violaxantina	443, 472	424, 452, 482
Zeaxantina	423, 451, 483	429, 462, 494
Neoxantina	415, 437, 466	421, 447, 477
Rubixantina	432, 462, 494	439, 474, 509
Fucoxantina	425, 450, 478	457, 492
Criptoxantina	425, 451, 483	433, 463, 497

El espectro IR generalmente no es muy útil para la caracterización de la mayoría de carotenoides; sin embargo, puede servir para el reconocimiento de carotenoides modificados, pues proporciona información sobre la presencia de otros grupos funcionales como grupos carbonilo y enlaces triple C-C (Mercadante, 1998).

Desde la década pasada, se ha generado un mayor interés en los carotenoides; más de 600 de ellos han sido identificados, de los cuales, 40 o 50 están presentes en una típica dieta. Los carotenoides son excelentes antioxidantes y pueden tener otras propiedades funcionales en el ser humano, además de la actividad de la vitamina A. Los carotenoides encontrados en la sangre humana incluyen α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina. De estos, solamente la luteína se encuentra en la retina del ojo humano y su presencia en él ha sido asociada con la disminución de pérdida de la vista (Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

El caroteno más comúnmente encontrado en las plantas es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25 – 30% del contenido total de carotenoides. La luteína es la xantofila más abundante (40 – 45%), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno (Britton y Hornero-Méndez, 1997).

Las xantofilas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en plantas verdes así como en flores y frutos como una combinación de diferentes carotenoides. En general, se encuentran en las plantas verdes como xantofilas libres (no esterificadas), contrario a lo que sucede en flores y frutos, tal como en la flor de cempasúchil, en donde se encuentran como ésteres de ácidos grasos (Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

4.1.1 Características generales de la luteína

La luteína es una xantofila que se encuentra naturalmente en vegetales, flores y frutos (Figuras 7 y 8). Industrialmente, se obtiene a partir de la flor de cempasúchil. Esta flor tiene la ventaja de que la mezcla de xantofilas obtenida de ella es extremadamente alta en un solo compuesto que es la luteína (sus pétalos secos tienen una concentración de luteína esterificada de alrededor del 80% del total de sus pigmentos).

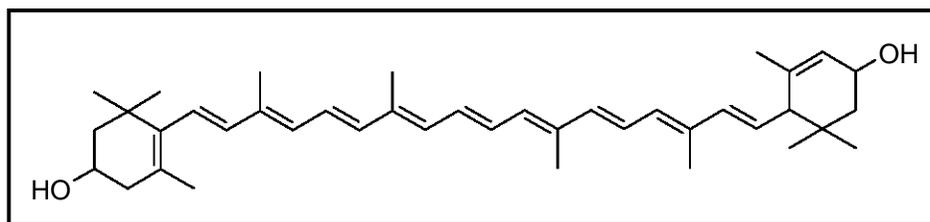


Figura 7. Luteína libre, como se encuentra en vegetales

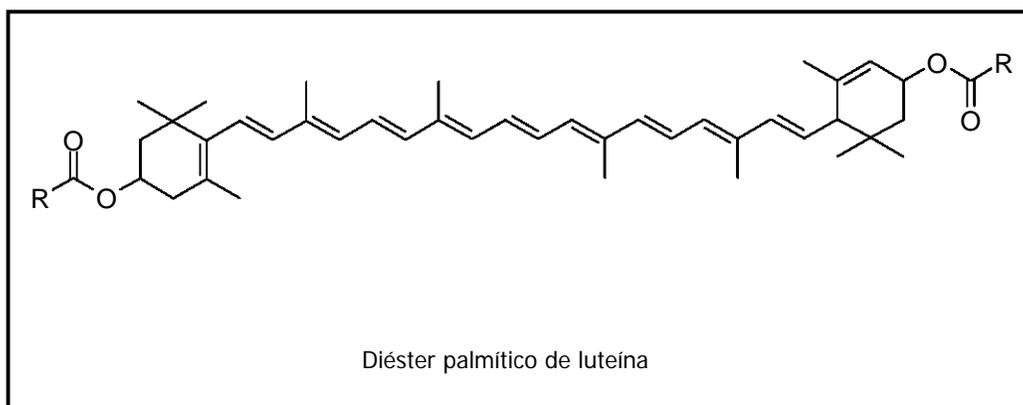


Figura 8. Luteína esterificada, como se encuentra en flores y frutas

En la tabla 2 se muestran las propiedades fisicoquímicas de la luteína libre en diferentes disolventes orgánicos.

Tabla 2. Solubilidad relativa y absorptividad de luteína en disolventes orgánicos
(Craft y Soares, 1992)

Disolvente	Solubilidad (mg/L)	λ_{max} , nm	Absortividad E%, cm^{-1}	Absortividad molar $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Acetona	800	446	2540	144500
Acetonitrilo	100	446	2559	145600
Benceno	600	456 (458)	2350	133700 (127200)
Cloroformo	6000	454 (458)	2369	134800
Ciclohexano	50	448	2520	143400
Ciclohexanona	4000	454	2359	134200
Diclorometano	800	452	2320	132000
DMF	1000	454	2390	136000
DMSO	1000	460	2369	134800
Etanol	300	444 (445)	2550	145100
Acetato de etilo	800	446	2529	143900
Eter etílico	2000	444	2629	149600
Hexano	20	444 (445)	2589	147300
2-propanol	400	444	2599	147900
Metanol	200	442 (444)	2629	149600
MTBE	2000	444	2589	147300
THF	8000	450	2469	140500
Tolueno	500	456	2290	130300

La cadena poliénica de la luteína da lugar a la existencia de isómeros *cis/trans*. Cada carbono con doble ligadura puede teóricamente tomar dos configuraciones, pero la mayoría de los carotenoides aislados de la naturaleza portan carbonos todos *trans* pues ésta es la forma más estable termodinámicamente. La configuración es muy importante en lo que a propiedades se refiere, por ejemplo, los isómeros *cis* son en general más solubles que los *trans*; pero los *trans* pueden más fácilmente penetrar en las estructuras celulares por su carácter lineal, por lo que se asimila más fácilmente. Los carotenoides *cis* pueden resultar de la isomerización de sus contrapartes *trans* bajo ciertas condiciones ambientales como el calor, la luz y el oxígeno (Britton, 1995). La figura 9 muestra la estructura de los isómeros de luteína.

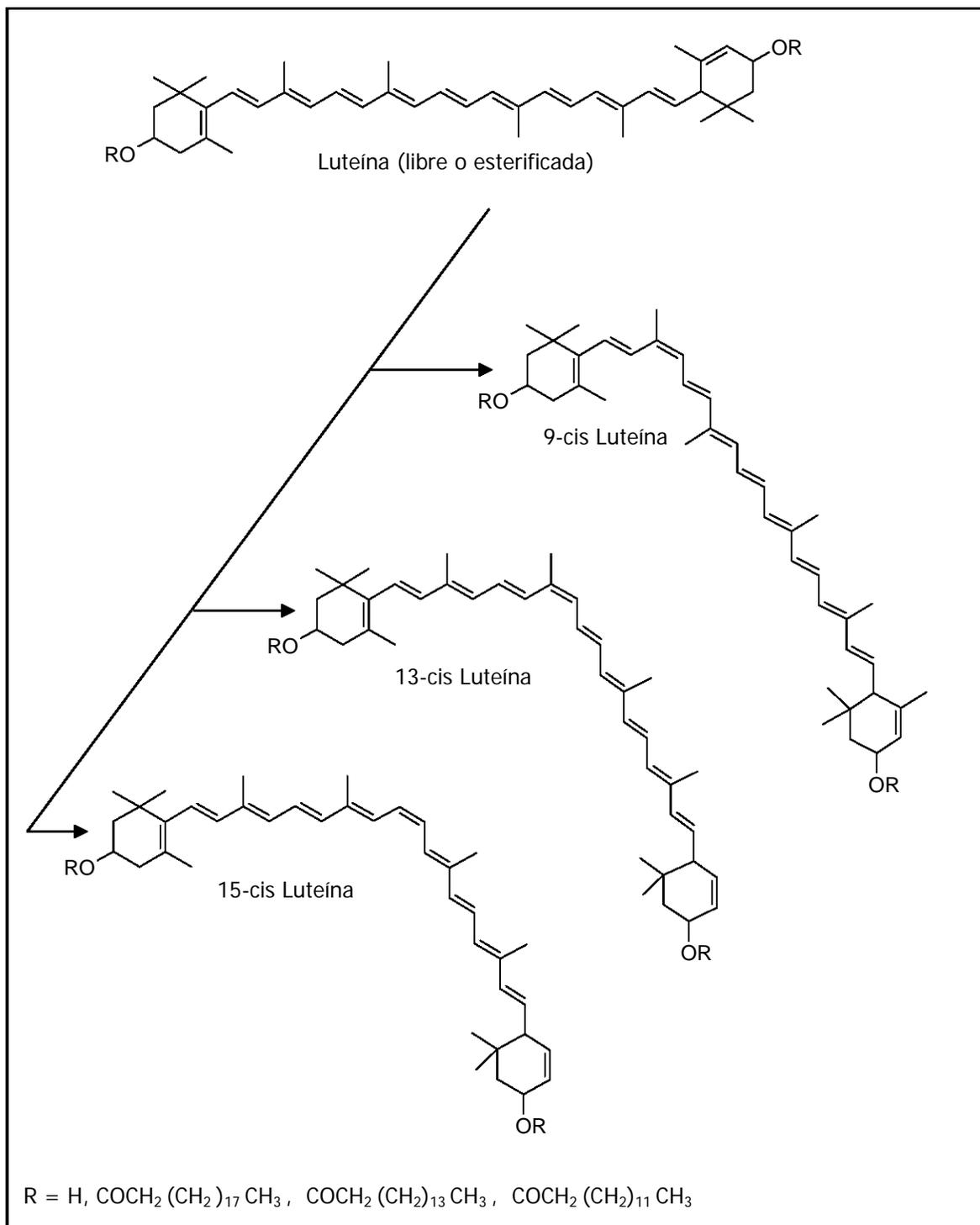


Figura 9. Estructura de isómeros de luteína

4.1.2 Papel de la luteína en la salud humana

Muchos estudios epidemiológicos han encontrado que el consumo de frutas y verduras que son ricas en carotenoides puede reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas, incluyendo ciertas formas de cáncer, enfermedades del corazón, y ciertos tipos de enfermedades oculares. La luteína y la zeaxantina, así como otros carotenoides, no son producidas por el cuerpo humano, por lo cual deben obtenerse de la dieta (Kritchevski, 1999). Las fuentes más importantes de luteína y zeaxantina se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Fuentes de luteína y zeaxantina (Alves-Rodrigues y Shao, 2004)

Fuente	Luteína ppm (mg/kg)	Zeaxantina ppm (mg/kg)
Berro	110	-
Espinaca	74	-
Pimiento (naranja)	25	85
Brócoli	202	-
Chícharo	20	-
Pimiento (verde)	11	-
Maíz tierno	5	5
Albaricoque	1	0.3

Se sabe que la eficiencia en la absorción de carotenoides está afectada por la presencia o ausencia de otros componentes de la dieta, tales como grasas y proteínas (Su et al., 2002).

4.1.2.1 La luteína en la salud del ojo

Dos tejidos oculares que juegan un papel crítico para la visión son la mácula y el cristalino. De todos los carotenoides presentes en la dieta humana y en el suero de la sangre, solamente dos – luteína y zeaxantina – están presentes en estos tejidos vitales (Figura 10) (Bone et al., 1985); debido a esto la luteína es conocida como “el nutriente protector del ojo”.

La mácula lutea (o “mancha amarilla”, por su característico color amarillo) está localizada en la parte central y posterior de la retina y posee la más alta concentración de fotorreceptores, los cuales son responsables de la visión central y de la alta resolución de la agudeza visual. Esta es un

área circular de entre 5-6 mm de diámetro y posee un pigmento de color amarillo, el pigmento macular, el cual está constituido enteramente de luteína y zeaxantina (Landrum y Bone, 2001). Mantener la salud de la mácula es crítico para mantener una función visual normal.

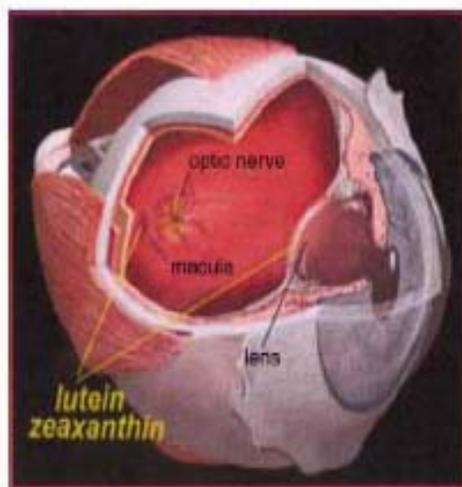


Figura 10. Ojo humano mostrado en una estructura 3D.

La luz que induce el daño retinal depende de la longitud de onda, el tiempo de exposición y el nivel de intensidad; con luz azul (440 nm) se requiere 100 veces menos energía para causar daño que con luz anaranjada (590nm). Como en el caso de las plantas, los carotenoides son capaces de absorber luz de la misma longitud de onda que en la mácula, lo cual indica que tienen una función protectora. Así mismo, la luteína parece jugar un papel específico como un agente fotoprotectivo del daño por exposición a la luz azul del sol (Ham et al., 1976).

El pigmento macular (tejido vascularizado) posee una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que la mácula es particularmente susceptible al daño oxidativo. La luteína podría también ofrecer una protección a las células de la mácula actuando como un antioxidante (Khachik et al., 1997). Se han publicado documentos proponiendo que la luteína y la zeaxantina ayudan a inhibir la formación de drusen (conjunto de células y proteínas dañadas por oxidación) y preservan la salud.

La oxidación en el ojo es alta de acuerdo a la exposición de la luz y el cristalino es la primera línea de defensa en contra del daño oxidativo para el resto del ojo. Las cataratas son comúnmente causadas por la oxidación de las proteínas, y la subsecuente precipitación de éstas daña al cristalino del ojo. Las concentraciones de luteína y zeaxantina son substancialmente

menores en el cristalino que en la mácula, manteniendo su función como protectores contra la luz azul y como antioxidantes funcionales (Mares-Perlman et al., 2002). Estos atributos únicos sugieren que el consumo de luteína reduce el riesgo de contraer Degeneración Macular relativa a la Edad (AMD), cataratas y otras enfermedades oculares.

4.1.2.2 Degeneración Macular relativa a la Edad (AMD) y Cataratas

El AMD se describe como la degradación de la porción central de la retina, incluyendo la mácula y es la principal causa de ceguera en la gente de 65 años o más. El AMD puede ser clasificado en dos categorías: temprano (o AMD seco) y tardío (o AMD húmedo). El primero está caracterizado por la acumulación de drusen suave causado por el daño oxidativo y la despigmentación del epitelio retinal, y el segundo caracterizado por la neovascularización de la mácula y la retina, y la acumulación de tejido cicatrizado. El área macular y la fovea se arreglan debido al pigmento epitelial detrás de la retina, degenerando y formando drusen, provocando como consecuencia la pérdida del fluido detrás de la fovea (Figura 11). Los conos de la fovea mueren causando pérdida de la visión central y reduciendo la capacidad de leer o de ver a detalle. Los factores de mayor riesgo para el AMD incluyen la edad y la exposición a la luz solar, seguido por fumar cigarrillos, y una mala alimentación (Christen, 1999). El AMD avanzado lleva a la ceguera irreversible, y actualmente no hay un tratamiento efectivo. Incluyendo luteína en la dieta, se incrementa el pigmento macular y puede mejorar la función visual en pacientes con AMD (Fine et al., 2000).

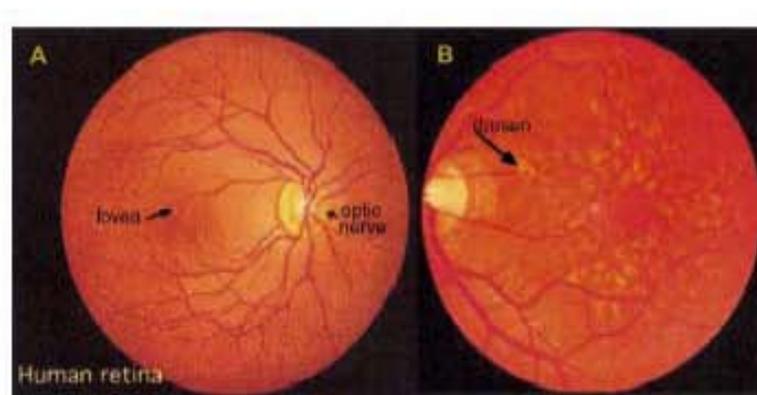


Figura 11. Estudio del ojo humano y la retina. (A) Retina saludable y (B) Retina de un paciente con AMD avanzado. Las manchas blancas con formas irregulares representan el drusen, un conjunto de células y proteínas dañadas por oxidación.

Las cataratas están caracterizadas por la presencia de opacidad ocular, parcial o completa en los cristalinos de uno o ambos ojos. La opacidad es causada por la precipitación de proteínas dañadas por oxidación en el cristalino del ojo, lo que lleva a una mala visión o ceguera (Bron et al., 2000).

La Retinitis Pigmentosa (RP) es una enfermedad degenerativa caracterizada por el atrofia del pigmento retinal, conduciendo al daño de los fotorreceptores y eventualmente a la ceguera. Hay pocos, si acaso, algunos tratamientos disponibles, aunque la suplementación de altas dosis de vitamina A ha sido probada para reducir el proceso degenerativo.

4.1.2.3 La luteína en la salud cardiovascular

La enfermedad coronaria del corazón está inversamente relacionada con el consumo de frutas y vegetales. Esto puede ser debido al alto contenido de antioxidantes en estos alimentos, tales como vitaminas A, C, E y carotenoides (Gey, 1993). Una dieta basada en carotenoides puede tener un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares y debe ser obtenida aumentando la ingestión de estos, particularmente luteína.

4.1.2.4 La luteína y la salud de la piel

Los carotenoides actúan como filtros de luz azul en las plantas, y la luteína juega un papel similar en la piel; hay evidencia que muestra que la luteína junto con otros carotenoides pueden tener un efecto protector contra el daño inducido por los rayos UV (Britton, 1995).

La exposición a los rayos UV provoca una respuesta inflamatoria en las células de la piel, resultando en un eritema o una apariencia rojiza. La dieta rica en antioxidantes tales como carotenoides ha mostrado reducir esta respuesta inflamatoria. Debido a que muchos carotenoides normalmente no absorben la luz UV, este efecto es aparentemente mediado por su función antioxidante (Krinsky, 2002).

No se ha establecido una relación directa entre la suplementación y la protección de la piel en los humanos, pero se sugiere que una dieta rica en carotenoides hace que estos se depositen en la piel. Sin embargo ningún estudio ha mostrado la relación entre el consumo de luteína y las capas

de piel. Todo indica, sin embargo, que la gente que regularmente ingiere multivitamínicos tiende a captar mayores niveles de luteína en la piel (y otros antioxidantes) que la gente que no los toma (Wingerath et al., 1998).

Debido a la relación entre la exposición a los rayos UV y el cáncer de piel, se sugiere que la luteína puede jugar un papel protector contra el cáncer de piel, primeramente como un filtro de luz azul, pero también como un colector de radicales libres (Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

4.1.2.5 La luteína como un nutriente esencial

Una vitamina es un nutriente esencial que debe ser obtenido de la dieta, y es requerida por el cuerpo para tareas específicas. Sin embargo, hoy en día en la sociedad occidental se piensa que una enfermedad crónica no es el resultado de una deficiencia, sino de un exceso (exceso de ingestión de alimentos, de exposición al sol, o de fumar) y la dieta humana se debe establecer para prevenir algo más que deficiencias para promover una buena salud (Alves-Rodrigues y Shao, 2004).

Los humanos no pueden sintetizar la luteína, por lo que es necesario obtenerla de la dieta (Krinsky, 1989). Incluyendo luteína en la dieta, incrementa el pigmento macular y puede mejorar la función visual en pacientes con AMD (Johnson et al., 2000). El MPD (Densidad del Pigmento Macular) no es una prueba de la salud de la mácula, pero puede ser un indicador del estado de la luteína en el cuerpo.

4.1.2.6 Absorción y depósito de luteína

La absorción de un componente alimenticio depende del tiempo, así como de otras variables incluyendo: (1) el estado de los alimentos (crudos, cocinados y/o procesados), (2) la presencia y eficiencia de las enzimas digestivas, y (3) la composición del alimento. El procesamiento es un importante factor de bioaccesibilidad. Por ejemplo, la disponibilidad para la absorción se mejora cuando las espinacas son cocinadas, la luteína muestra una bioaccesibilidad del 21%, mientras que menos del 1% de licopeno es absorbido de los tomates frescos o enlatados.

Un gran número de factores no dietéticos tienen el potencial para influenciar la biodisponibilidad de los carotenoides; algunas de las más comunes son: edad, género, consumo de

cigarrillos, consumo de alcohol, mala digestión de grasas y mala absorción, enfermedades de hígado y riñón (Williams et al., 1998).

El consumo necesario de luteína puede ser alcanzado mediante el uso de suplementos alimenticios. Hay dos formas de luteína disponibles para la incorporación en los suplementos y en los alimentos, luteína purificada cristalina y ésteres de luteína. La luteína cristalina purificada es la forma más prevalente en la dieta, particularmente en vegetales verdes frondosos (aunque no tan evidente debido al efecto de máscara de la clorofila) como las espinacas y los quelites. Los ésteres de luteína tienden a ser menos frecuentes y están presentes en pequeñas cantidades en frutas amarillas-anaranjadas como los duraznos y las naranjas (DeFreitas, 2000). Los diésteres de luteína poseen ácidos grasos (principalmente ácidos palmítico y mirístico) adicionados al final de la molécula de luteína, los cuales deben de ser removidos por las lipasas del intestino antes de la absorción. No es claro hasta qué grado estas dos formas difieren con respecto a su seguridad y eficacia en humanos. La información indica que la desesterificación de ésteres de luteína es un proceso ineficiente, y es altamente afectado por el contenido de grasas en la dieta, sugiriendo que la biodisponibilidad puede ser menor en la luteína esterificada (Breithaupt et al., 2002).

4.1.2.7 Evaluación de seguridad

El único efecto reportado como resultado de la suplementación de luteína en humanos ha sido la carotenodermia (una inofensiva y reversible hiperpigmentación cutánea análoga a la ictericia) (Granado et al., 1998). Esta condición, la cual en sí no es conocida por estar asociada con ningún efecto específico adverso, resulta del excesivo consumo de carotenoides y no es solamente atribuido al alto consumo de luteína.

Estudios de suplementación realizados en fumadores a mediados de 1990 revelaron que altas dosis de β -caroteno (≥ 20 mg por día) pueden ser responsables de un incremento de incidencia en el cáncer de pulmón, y han sido la base para un consumo restringido de los suplementos de carotenoides (Omenn et al., 1996).

4.1.3 La luteína en la naturaleza

En las plantas la luteína funciona como un antioxidante y las protege del daño fotoinducido por radicales libres (Baroli y Niyogy, 2000).

La luteína con su pico de absorción máxima en 446 nm en el espectro de luz visible, atrapa la luz azul y protege a las plantas, permitiendo captar otras longitudes de onda de luz crítica para la fotosíntesis. Aunque no tan evidente en los vegetales frondosos verdes debido al efecto de máscara de la clorofila, la luteína cristalina purificada presenta un color amarillo-anaranjado.

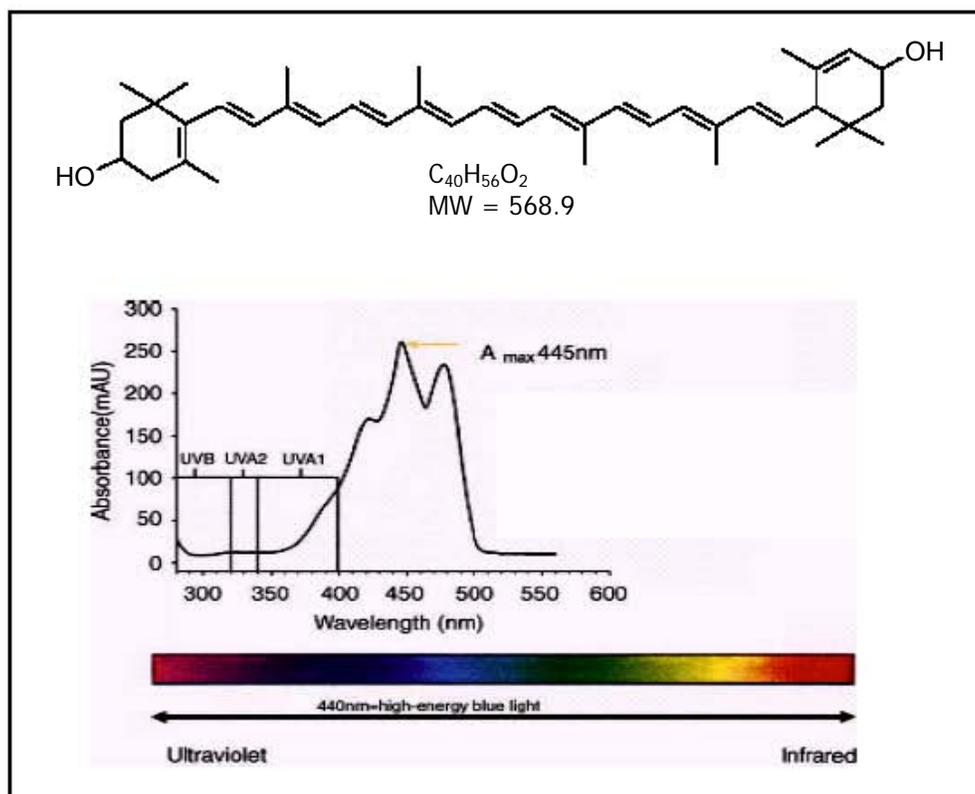


Figura 12. Espectro de absorción de la luteína. El pico de absorción de la luteína a 446 nm corresponde a la longitud de onda de luz azul en el espectro visual

4.1.4 La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)

La flor de cempasúchil (Figura 13) pertenece a la familia de las compuestas (*Compositae*) y es originaria de América. Las distintas especies de *Tagetes* conocidas, que en la actualidad suman 40, crecen en distintas regiones de este continente, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina. Algunas de ellas se encuentran distribuidas en todo el mundo por ser utilizadas como plantas de ornato (Lawrence, 1985).

Tagetes erecta es una planta herbácea, anual, que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Sus hojas son opuestas, divididas y olorosas; las flores son grandes (5 o 6 cm de diámetro), de color amarillo o anaranjado. Las flores dobles son las que se cultivan preferentemente, puesto que el rendimiento de colorantes es más alto. En cultivo anual, esta especie florece alrededor del mes de octubre. Existen variaciones en el tamaño y la forma de las hojas y flores entre las diversas subespecies de *Tagetes erecta* (Naranjo-Modad, 2000).



Figura 13. Flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)

Debido a la alta concentración de xantofilas, los pétalos de *Tagetes erecta* han sido utilizados como fuente de coloración añadida al alimento para pollos y aves de postura con la finalidad de colorear su piel y la yema de los huevos que ponen (Alam et al., 1968); contienen 1.6% de carotenoides y aproximadamente el 80% de esa parte corresponde a ésteres de luteína (Philip y Berry, 1975). En el caso de *T. erecta* el pigmento mayoritario es la luteína diesterificada y ocurre principalmente en su configuración trans.



Figura 14. Cristales de luteína aislados de la flor de cempasúchil

Las xantofilas presentes en la flor de cempasúchil son una mezcla de ésteres de ácidos grasos (Tabla 4).

Tabla 4. Xantofilas presentes en la flor de cempasúchil como mezcla de ésteres de ácidos grasos (Alves-Rodrigues y Shao, 2004)

Xantofilas	Composición (%)
Luteína	70.0 – 85.0
Zeaxantina	5.0 – 7.0
Criptoxantina	0.5 – 1.0
Cis-luteína (o epoxidos)	7.0 – 24.5

Se ha encontrado que el principal pigmento de la flor de cempasúchil es la luteína mono y diesterificada con los ácidos palmítico y mirístico (Philip y Berry, 1976). La naturaleza de los ésteres de los ácidos grasos presentes varía dependiendo de la clase de flor y de factores como la localización geográfica, el clima y las prácticas agrícolas (Tabla 5).

Tabla 5. Ácidos grasos encontrados como xantofilas en la flor de cempasúchil (Alves-Rodrigues y Shao, 2004)

Acidos Grasos	Composición (%)
Saturados	
- Ac. Palmítico (C ₁₆)	44.5
- Ac. Mirístico (C ₁₄)	23
- Ac. Araquídico (C ₂₀)	12
- Ac. Esteárico (C ₁₈)	11
- Ac. Laúrico (C ₁₂)	2
No saturados	
- Ac. Linoleico (C ₁₈₋₂)	3
- Ac. Oleico (C ₁₈₋₁)	2
- Ac. Linolénico (C ₁₈₋₃)	1
Otros ácidos	1.5

La purificación de los diésteres consiste en llevar a cabo una extracción con disolventes y posteriormente precipitarlos con isopropanol:éter de petróleo (80:20) (Philip y Berry, 1976). Para purificar la luteína se extraen los pigmentos ya saponificados, después se precipitan y son recristalizados con una solución hexano:acetona (80:20) (Tyczkowski y Hamilton, 1991). La luteína también se puede cristalizar con metanol (Davies, 1976).

4.1.4.1 Importancia comercial de *Tagetes erecta*

La manufactura moderna de los alimentos requiere aditivos de color; éstos están clasificados como colores certificados (manufacturados sintéticamente) y colores no certificados (sustancias derivadas naturalmente). Los aditivos de colores no certificados son obtenidos de fuentes naturales, tales como vegetales, animales o minerales. Los carotenoides son los responsables de los pigmentos amarillo, anaranjado y rojo en una gran variedad de seres vivos, alimentos procesados y animales, incluyendo zanahorias, jitomates, mantequilla, queso, pimienta, aceite de palma, almendra, pétalos de flor de cempasúchil y salmón, entre otros (Shibamoto y Bjeldanes, 1993; Newsome, 1990; Noonan, 1990). Tanto los colores certificados como los no certificados están estrictamente controlados en México por la Secretaría de Salud.

En México se encuentra el mayor número de productores de colorantes de *T. erecta* a nivel mundial y se exportan a países como Japón, España y E.U.A. Hasta el momento, la mayoría de la venta de este producto está destinada a la alimentación animal. Se estima, que la demanda mundial de este tipo de colorantes crece anualmente a un ritmo del 2 al 6%, cifra que podría incrementarse debido a que se reconocen como regeneradores de tejidos dañados, lo que podría conferirles un carácter de fármacos preventivos contra el cáncer, las enfermedades coronarias y la degradación macular en los ojos (Howard et al., 1996).

El proceso industrial de extracción de xantofilas se representa en la figura 15. La saponificación es generalmente llevada a cabo durante la manufactura de preparaciones comerciales para incrementar el valor de la pigmentación del extracto debido a que los pigmentos no esterificados se absorben dos veces más rápido que los diésteres en el tracto digestivo de los pollos (Huddon, 1994). Dado que la saponificación representa un paso adicional en el proceso, resulta de interés el poder llevar a cabo la desesterificación en forma simultánea a la extracción con hexano, reacción que es potencialmente factible con enzimas lipolíticas según se describe a continuación.

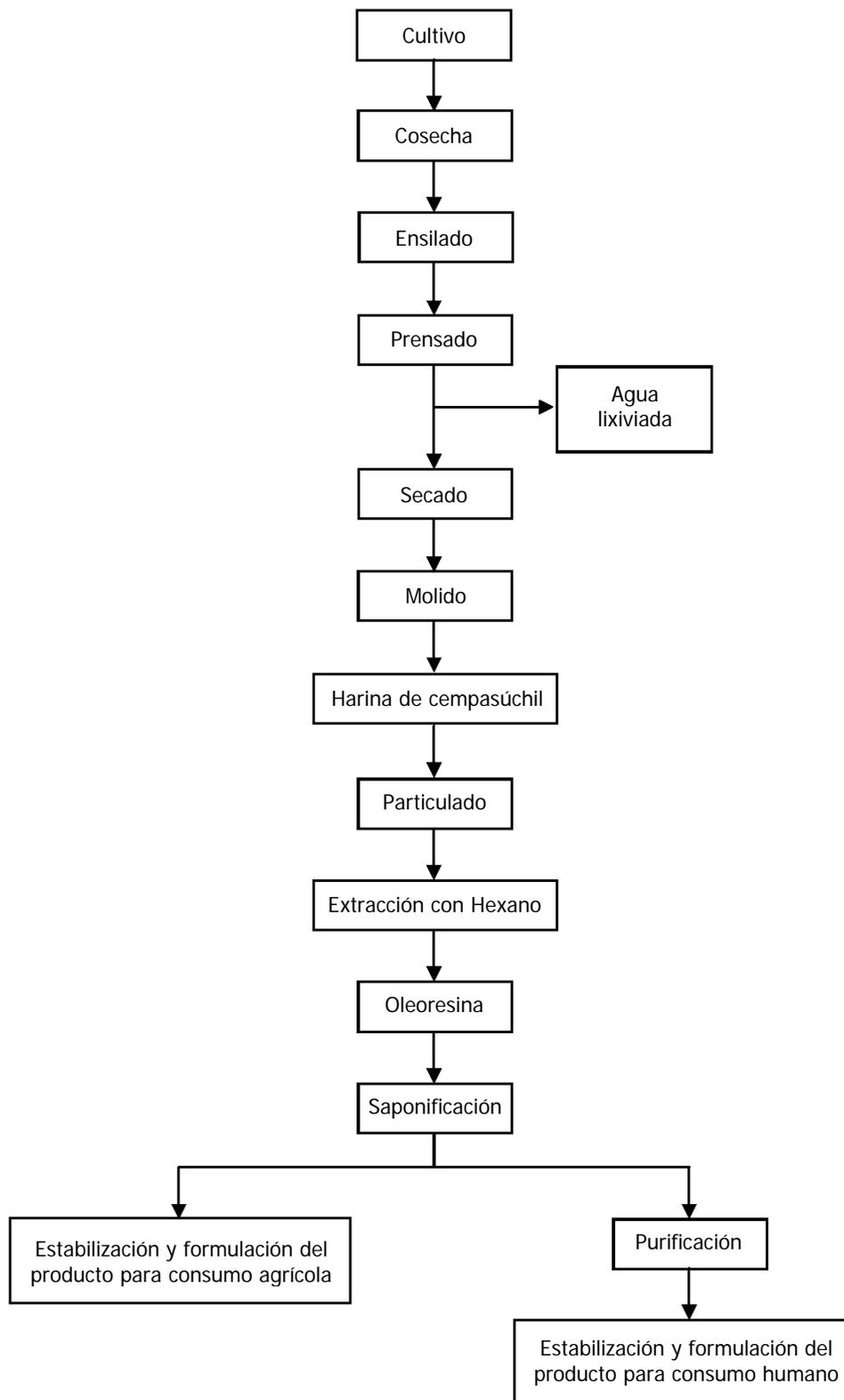


Figura 15. Proceso de extracción de xantofilas a partir de la flor de cempasúchil

4.2 Generalidades de las lipasas

Las ventajas que se derivan de utilizar enzimas en una aplicación tecnológica son su alta actividad y que puede elegirse aquella que reconozca exclusivamente a uno de los componentes contenidos en una mezcla compleja (Gacesa y Hubble, 1990). Los campos de aplicación de las enzimas se ilustran en la tabla 6.

Tabla 6. Campos de aplicación de las enzimas (Sharma et al., 2001)

Investigación científica: Herramienta de investigación para la hidrólisis, síntesis, biotransformaciones y separaciones de afinidad.

Aplicaciones cosméticas: Cosméticos para la piel, productos de limpieza dental.

Diagnóstico médico y análisis químico: Glucosa en la sangre, urea, colesterol, sistemas de ELISA, electrodos de enzimas y herramientas de ensayo.

Aplicaciones terapéuticas: Agentes antitrombosis, tratamientos antitumorales, agentes antiinflamatorios, enfermedades digestivas, etc.

Catálisis industrial: Síntesis de compuestos activos, industria cervecera y de vinos, transformación de lácteos, procesamiento de frutas, carnes y verduras, modificaciones de almidón, encurtido de piel, manufactura de pulpa y papel, proceso de azúcar y confitería, producción de jarabes de fructosa, agentes de limpieza y detergentes, síntesis de aminoácidos y químicos, tratamiento de aguas de desecho, manufactura de algodón y textiles.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3) son enzimas obicuas de considerable importancia fisiológica y potencial industrial; son estables y activas en algunos disolventes orgánicos y muestran una amplia especificidad por el sustrato, frecuentemente combinada con una alta regio- y estereoselectividad. Catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres; su reacción es reversible, por lo que pueden efectuarse alternativamente reacciones de hidrólisis o de síntesis en función del potencial químico de las especies presentes (Martinelle et al., 1995). Están activas solamente cuando se han adsorbido en una interfase agua/lípido en lo que se conoce como activación interfacial (Uppenberg et al., 1994). Las lipasas desarrollan una pequeña actividad en soluciones acuosas conteniendo sustratos solubles como ésteres simples.

Las lipasas comercialmente útiles son obtenidas usualmente de microorganismos que producen una gran variedad de lipasas extracelulares. Muchas de ellas presentan actividad en

disolventes orgánicos donde catalizan un gran número de reacciones útiles, incluyendo la esterificación (Chowdary et al., 2001), transesterificación, acilación regioselectiva de glicoles y mentoles, síntesis de péptidos y otros químicos (Therisod y Klibanov, 1987; Liese et al., 2000). La mayor ventaja de las reacciones catalizadas por lipasas, es que se pueden obtener una gran variedad de productos con diferente composición y propiedades dependiendo de la regio-especificidad de la enzima por el sustrato.

4.2.1 Aplicaciones industriales de las lipasas

Las lipasas encuentran aplicaciones prometedoras en los procesos de química orgánica, formulación de detergentes, síntesis de biosurfactantes, industria oleoquímica, industria láctea, industria agroquímica, manufactura de papel, nutrición, cosméticos y procesos farmacéuticos. El desarrollo de la tecnología basada en lipasas para la síntesis de nuevos compuestos se está expandiendo rápidamente (Liese et al., 2000). Un factor limitante para su aplicación es la escasez de lipasas que tengan las características específicas requeridas en un determinado proceso. La mayor aplicación comercial para las lipasas hidrolíticas es su uso en detergentes, pero necesitan ser termoestables y permanecer activas en un ambiente alcalino típico de una lavadora de ropa casera o industrial (Jaeger y Reetz, 1998).

Una menor cantidad de lipasas son usadas en transformaciones oleoquímicas (Bornscheuer, 2000). Las lipasas pueden jugar un papel importante en procesos de producción como en el caso del ácido γ -linolénico, un ácido graso poliinsaturado; astaxantina, un colorante alimenticio; metil cetonas, molécula característica del queso tipo Roquefort; ácido 4-hidroxicanoico usado como un precursor de γ -decalactona, un saborizante de frutas; ácidos dicarboxílicos para su uso como prepolímeros; interesterificación de gliceridos más baratos a formas más valiosas (sustituto de manteca de cacao para su uso en la manufactura de chocolate); modificación de aceites vegetales de la posición 2 de triglicéridos, para obtener grasas similares a la de la leche materna para su uso en la alimentación de bebés; ésteres de lípidos incluyendo isopropil miristato, para su uso en cosméticos; y monoglicéridos, para su uso como emulsificantes en alimentos y aplicaciones farmacéuticas (Sharma et al., 2001).

Asimismo, el incremento en el conocimiento de la importancia de la quiralidad en el contexto de la actividad biológica ha estimulado una creciente demanda de métodos eficientes para síntesis industrial de enantiómeros puros, incluyendo medicinas antiinflamatorias quirales, tales

como naproxeno, agentes antihipertensivos, inhibidores y las medicinas bloqueadoras del canal de calcio (Berglund y Hutt, 2000).

4.2.1.1 Lipasas en síntesis orgánica

Las lipasas han sido utilizadas para catalizar una gran variedad de transformaciones químico, regio y estereoselectivas (Rubin y Dennis, 1997; Kazlauskas y Bornscheuer, 1998). La mayoría de las lipasas como catalizadores en química orgánica son de origen microbiano. Las reacciones catalizadas por lipasas pueden llevarse a cabo en disolventes orgánicos con muy poca cantidad de agua o en sistemas bifásicos, donde trabajan en una interfase hidrofílica-lipofílica.

Las enzimas catalizan la hidrólisis de triglicéridos inmiscibles en agua en la interfase agua-líquido. La cantidad de agua en la mezcla de reacción determinará la dirección de la reacción catalizada por la lipasa. Cuando no hay agua o hay una pequeña cantidad, solamente la esterificación y la transesterificación son favorecidas. Por razones termodinámicas la hidrólisis es la reacción favorecida cuando hay un exceso de agua (Klibanov, 1997).

Las enzimas en medios orgánicos sin una fase acuosa son conocidas por desarrollar propiedades inusuales y estas han sido firmemente establecidas como sistemas enzimáticos no acuosos para síntesis y biotransformaciones (Klibanov, 1997).

4.2.2 Estabilidad térmica de las lipasas

La rapidez de una reacción generalmente aumenta con el incremento de la temperatura. Asumiendo que la enzima es estable a temperaturas elevadas, la productividad de la reacción puede incrementarse apreciablemente operando a temperaturas relativamente elevadas. Consecuentemente la estabilidad térmica es una característica deseable de las lipasas (Janssen et al., 1994).

La estabilidad térmica de una lipasa está relacionada con su estructura. Esta propiedad está influenciada por factores ambientales como el pH y la presencia de iones metálicos. En algunos casos la desnaturalización térmica parece ocurrir a través de estados intermedios de los polipéptidos. Mutaciones en la región de la tapa (lid) del sitio activo de la enzima pueden afectar significativamente la estabilidad térmica (Zhu et al. 2001).

Comparado con la enzima nativa, la estabilidad operacional y térmica de muchas lipasas pueden ser mejoradas mediante la inmovilización (Arroyo et al., 1999). La lipasa B de *Candida antarctica* puede ser térmicamente estabilizada por inmovilización, situación en la cual la enzima nativa y la preparación inmovilizada covalentemente parecen seguir modos diferentes de desactivación térmica (Arroyo et al., 1999).

El primer paso universalmente reconocido en la desactivación térmica de una enzima es el desdoblamiento de la molécula proteica (Malcata et al., 1992). Este desdoblamiento, con o sin cambios conformacionales subsecuentes, lo requiere la molécula en cuestión para tener libertad o movimiento. Por lo tanto, la retención de la molécula de la enzima en una conformación rígida que restringe su movilidad (por inmovilización) no permitiría el fácil desdoblamiento, lo que reduce su susceptibilidad a agentes desnaturalizantes tales como el disolvente y la temperatura (Gandhi et al., 1997).

4.2.3 Actividad del agua (a_w) en las lipasas

En las reacciones de lipasas en fase orgánica el agua tiene un papel ambiguo. Las enzimas son utilizadas en medios orgánicos ligeramente hidratados, por lo que una pequeña cantidad de agua en el disolvente es necesaria para activar a la enzima. La cantidad de agua varía dependiendo de la naturaleza del soporte de las enzimas inmovilizadas; esto refleja diferencias en la distribución del agua entre el disolvente orgánico, la enzima y el soporte (Arroyo et al., 1996).

El agua presente en las enzimas puede estar más o menos “disponible” y así se distingue una parte inmóvil y una parte activa. La parte activa es la cantidad de agua que, bajo circunstancias normales, puede ser intercambiada entre el producto y su ambiente.

La actividad de agua, mide la presión de vapor generada por la humedad presente en una muestra.

$$a_w = p/p_s$$

donde:

p = presión parcial de vapor de agua en la superficie del producto

p_s = presión de saturación o presión parcial de vapor de agua

La catálisis enzimática en medios no acuosos ha ganado considerable importancia en la preparación de una gran variedad de productos naturales, farmacéuticos e ingredientes alimenticios (Klibanov, 1990; Vulfson, 1993).

Las enzimas pueden comportarse bastante atípicamente en disolventes orgánicos secos ya que muestran requerimientos muy diferentes con respecto a la cantidad de agua que necesitan para mantener un nivel apreciable de actividad catalítica (Aldercreutz, 1991; Zaks y Klibanov, 1988). También se ha demostrado que la estabilidad de las enzimas se incrementa a bajos niveles de agua, haciendo posible la biotransformación a mayores temperaturas que aquellas usadas en disolventes acuosos convencionales (Aldercreutz y Mattiasson, 1987; Turner et al., 1995; Volkin et al., 1991).

Aunque una enzima particular tiene un requerimiento absoluto de la cantidad de agua necesaria para que pueda adoptar la conformación activa apropiada, en la práctica esto representa una mínima cantidad. Por esta razón, es esencial que el disolvente sea inmisible con el agua, de otra manera el agua sería removida y la enzima no conservaría su actividad. Las ventajas adicionales de utilizar sistemas de bajo contenido en agua son que las enzimas pueden ser más estables y pueden catalizar nuevas reacciones (Gacesa y Hubble, 1990).

A bajos valores de a_w , muchas reacciones paralelas que son dependientes de agua, pueden ser prevenidas, incluyendo la desnaturalización de enzimas, las cuales, en medios orgánicos muestran una mayor estabilidad térmica. En ausencia de agua, la síntesis por hidrolasas (principalmente lipasas y proteasas) de grupos éster y amida pueden ser favorecidas por encima de la hidrólisis. Por la variación del disolvente orgánico es posible controlar la especificidad del sustrato, la regio y enantio-selectividad de una enzima dada (Carrea et al., 1995). Sin embargo, aunque las enzimas en medios orgánicos muestran numerosas ventajas, su eficiencia catalítica es, en muchos casos, órdenes de magnitud menores que en sistemas acuosos. Esta conducta puede ser atribuida a diferentes causas, tales como limitaciones difusionales, concentraciones de sustrato altamente saturantes, limitada flexibilidad de proteínas, baja estabilidad del intermediario enzima-sustrato, e incluso la desnaturalización parcial de las enzimas por liofilización, la cual llega a ser irreversible (Klibanov, 1997).

Los cambios químicos y estructurales que causan inactivación térmica irreversible de las enzimas requieren todos de agua y por consiguiente se puede predecir un incremento de la estabilidad en disolventes orgánicos. La carencia de agua aumenta el grado de rigidez de las moléculas de la enzima y esto puede tener ciertos efectos sobre su especificidad (Gacesa y Hubble, 1990).

La causa más común de inactivación de las enzimas a alta temperatura es la pérdida del estado nativo, conformación competente catalíticamente. La temperatura a la cual la proteína sufre desnaturalización térmica (T_d) es fuertemente dependiente de la cantidad de agua asociada con la proteína. A baja actividad de agua, las enzimas deben ser catalíticamente activas a temperaturas alrededor de 90 y 120°C (Turner y Vulfson, 2000).

4.2.4 Lipasa de *Candida antarctica*

La levadura *Candida antarctica* muestra una actividad no específica hacia triglicéridos la cual es conservada aún a altas temperaturas. Dos diferentes lipasas, A y B, con diferentes puntos isoeléctricos y pesos moleculares han sido aisladas. La lipasa A no es específica, es dependiente del calcio y altamente termoestable; tiene un peso molecular de 45 kDa y un PI de 7.5. La lipasa B (CALB) es independiente del calcio y menos termoestable; tiene un peso molecular de 33 kDa y un PI de 6.0; esta enzima no muestra una especificidad estricta hacia el sustrato, lo cual la hace muy atractiva para su uso en la industria de productos de la química fina (Uppenberg et al., 1994).

La lipasa A tiene baja actividad con los ésteres simples, mientras que la lipasa B es muy activa con una gran variedad de ésteres, amidas y tioles (Anderson et al., 2000). CALB no muestra activación interfacial y no contiene región de "lid" que cubra el sitio activo; es activa con sustratos insolubles y solubles en agua (Uppenberg et al., 1994). Su cadena polipeptídica está compuesta de 317 aminoácidos y su tamaño es de aproximadamente 30 x 40 x 50 Å; la triada Ser-His-Asp es la responsable de la reacción catalítica.

El mecanismo de acilación-desacilación del glicérido en el sitio activo se muestra en la Figura 16. En la etapa de la acilación se forma un complejo covalente enzima-acilo por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo sobre el carbono carbonilo del sustrato (la serina se convierte en un nucleófilo fuerte por la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico); posteriormente, el anillo imidazol de la histidina se protona y se carga positivamente, estabilizado

por la carga negativa de los ácidos aspártico y glutámico del sitio activo. En seguida se forma un intermediario tetraédrico, estabilizado por los dos enlaces de hidrógeno formados con residuos oxianiónicos estabilizantes, es entonces cuando un rompimiento en el enlace carbono-oxígeno causa el desplazamiento del alcohol.

Durante la reacción, el acilglicerol es asociado con la tríada catalítica a través de enlaces covalentes; el hidrógeno de la histidina enlaza a la serina y al oxígeno del grupo alcohol saliente, a continuación el ataque nucleofílico del agua o el alcohol causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono del carbonilo, produciendo un intermediario tetraédrico, el cual se colapsa, desprendiendo el acilglicerol alterado y regenerando el sitio activo de serina (Reyes y Hill, 1994; Marangoni y Rousseau, 1995; Bousquet-Dubouch, et al., 2001).

Una forma comercial común de esta lipasa es Novozym 435 de la compañía Novo, la cual está inmovilizada en una resina acrílica macroporosa. Su densidad es de 430 kg/m³, con diámetro de 0.3–0.9 mm y tiene un contenido de agua de 1-2%. CALB se obtiene a partir del microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente con el gen correspondiente de *Candida antarctica*. La especificidad posicional de Novozym 435 para triacilglicéridos depende de los reactivos utilizados. En algunas reacciones muestra especificidad por la posición 1, 3; mientras que en otras reacciones funciona como una lipasa sin especificidad posicional (Novo Nordisk).

La inmovilización de la enzima le proporciona estabilidad y le permite ser utilizada en medios orgánicos por cientos de horas a una temperatura entre 60 y 80°C sin perder su actividad significativamente. En cuanto a disolventes, puede ser utilizada en varios disolventes apolares como hexano e isooctano; también puede emplearse para reacciones de síntesis y de hidrólisis en medios no polares, e inclusive en reacciones sin disolvente donde un reactivo es también el medio de reacción (Anderson et al., 2000).

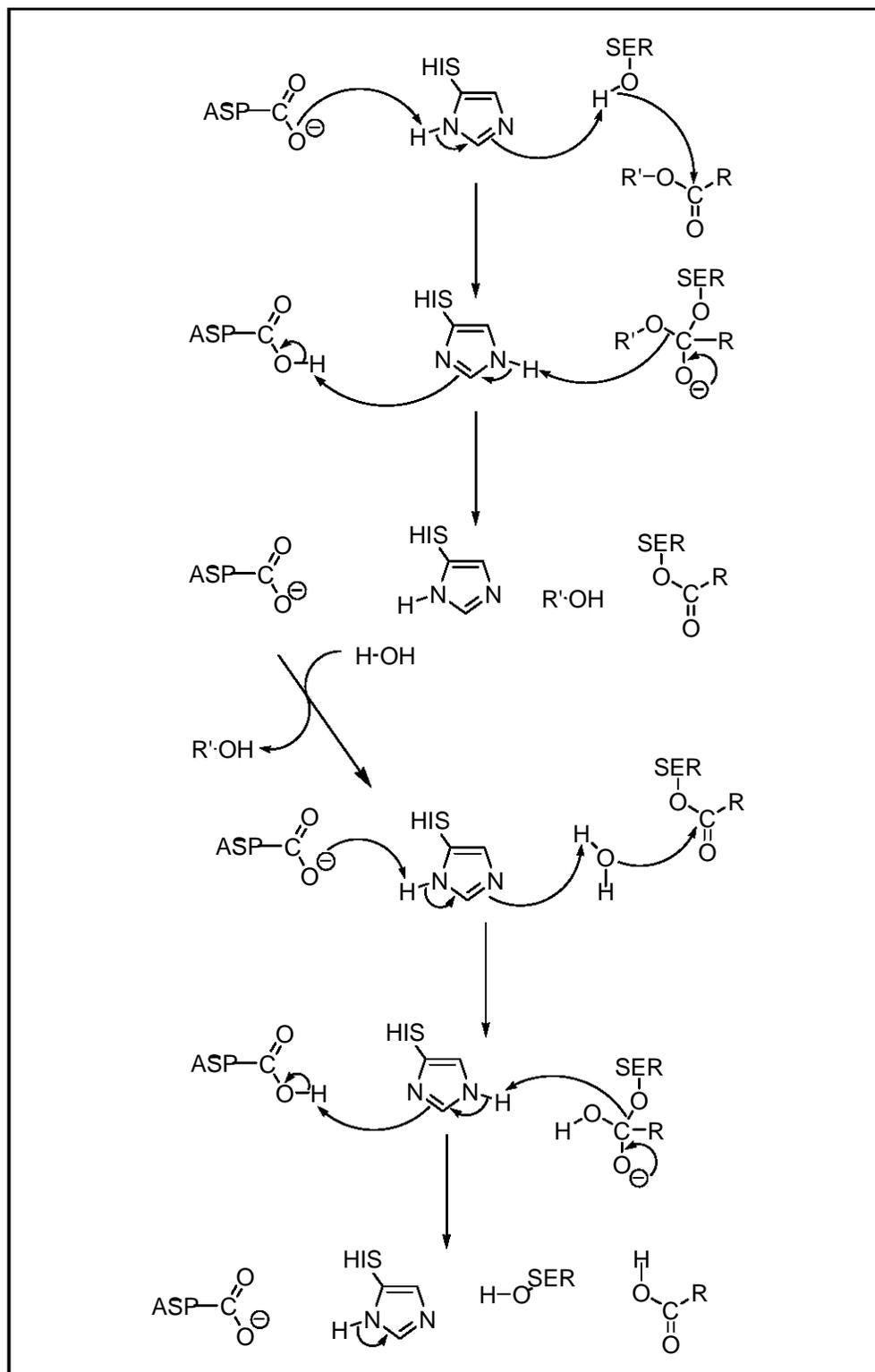


Figura 16. Mecanismo de la reacción de hidrólisis catalizada por *Candida antarctica*

4.2.5 Lipasa de *Rhizomucor miehei*

La forma comercial de esta lipasa es Lipozyme RM 1M de la compañía Novozymes A/S y es producida por la fermentación sumergida del microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente. Lipozyme RM 1M es un producto granular con un tamaño de partícula de 0.2-0.6 mm y pertenece a la clase de las triacilglicerol hidrolasas (EC. 3.1.1.3). Se comercializa inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico de tipo fenólico y sin requerir agentes entrecruzantes. Lipozyme RM 1M contiene generalmente 2-3% de agua y su densidad es de 350-450 kg/m³ (Novozymes A/S).

Lipozyme RM 1M puede ser usada a temperaturas entre 30 y 70°C y en disolventes tales como éter de petróleo o n-hexano.

4.3 Logaritmo del coeficiente de partición (log P)

El logaritmo del coeficiente de partición, log P, es una medida cuantitativa de la polaridad del disolvente. La actividad enzimática es baja en disolventes polares (log P < 2), moderada en disolventes con un valor de log P entre 2 y 4, y alta en disolventes apolares (log P > 4). La relación entre polaridad (log P) y actividad catalítica compara la actividad y la capacidad de los disolventes orgánicos para distorsionar la capa esencial de agua que estabiliza al biocatalizador (Laane et al., 1987). Por otro lado, el valor de log P muestra el grado al cual un compuesto se particiona entre el sistema bifásico octanol-agua.

Las ventajas de las reacciones biocatalíticas en disolventes orgánicos son (Carrea et al., 1995; Klivanov, 1986; Zaks y Klivanov, 1985):

- a) La relativamente alta solubilidad de muchos compuestos.
- b) La capacidad para revertir reacciones hidrolíticas hacia reacciones de síntesis en medios no acuosos.
- c) La posibilidad de disminuir reacciones indeseables, así como la inhibición por sustrato y producto.
- d) La relativamente fácil recuperación del biocatalizador y del producto de sistemas que contienen una fase orgánica.
- e) La termoestabilidad de las enzimas se incrementa.

El uso de disolventes orgánicos en síntesis enzimática está limitado porque muchos disolventes orgánicos inactivan o desnaturalizan al biocatalizador. Una pregunta clave al respecto es: ¿cuáles disolventes orgánicos inhiben al biocatalizador y por qué?. Brink y Tramper (1985) fueron los primeros en tratar de responder esta pregunta. Ellos estudiaron la influencia de varios disolventes orgánicos inmiscibles en agua sobre la biocatálisis en general. Usando el parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ), como una medida de la polaridad del disolvente, se concluyó que se puede esperar una alta rapidez biocatalítica cuando la polaridad del disolvente orgánico es baja ($\delta < 8$) y su peso molecular es > 150 .

Esta clasificación está relacionada con la capacidad de los disolventes orgánicos de atrapar (o remover) agua y es únicamente relevante para los disolventes que son miscibles en agua (Tabla 7).

Tabla 7. Máxima solubilidad de disolventes orgánicos en agua contra el valor de log P (Riddick y Bunger, 1970)

log P	Solubilidad en agua (20°C) (%peso)
$\log P \leq 2$	0.4
$2 < \log P < 4$	0.04 – 0.4
$\log P \geq 4$	< 0.04

La biocatálisis en disolventes orgánicos está gobernada por las siguientes reglas (Laane et al., 1987):

- Los disolventes que tienen un valor de $\log P < 2$ no son apropiados en sistemas biocatalíticos debido a que distorsionan fuertemente la interacción agua-biocatalizador, además de promover su inactivación.
- Los disolventes que tienen un valor de $\log P$ entre 2 y 4 son débiles distorsionadores de agua y afectarán la actividad biológica hasta cierto grado que es todavía impredecible.
- Los disolventes que tienen un valor de $\log P > 4$ no distorsionan la capa esencial de agua manteniendo al biocatalizador en un estado activo.

La tabla 8 muestra una lista de los disolventes orgánicos usados comúnmente con su correspondiente valor de log P. Se puede observar que muchos disolventes (~50%) tienen un log P < 2, por lo que no son apropiados para la síntesis enzimática. Sólo cerca del 20% de los disolventes listados resultan apropiados para este propósito (log P > 4).

Tabla 8. Valores de log P de los disolventes orgánicos usados comúnmente
(Harnisch et al., 1983)

Disolventes	log P	Disolventes	log P	Disolventes	log P
Dimetilsulfóxido	-1.3	Trietilamina	1.6	Benzofenona	3.2
Dioxano	-1.1	Acetato de bencilo	1.6	Propoxibenceno	3.2
N,N-dimetilformamida	-1.0	Acetato de butilo	1.7	Dietilftálato	3.3
Metanol	-0.76	Cloropropano	1.8	Nonanol	3.4
Acetonitrilo	-0.33	Acetofenona	1.8	Decanona	3.4
Etanol	-0.24	Hexanol	1.8	Hexano	3.5
Acetona	-0.23	Nitrobenceno	1.8	Propilbenzeno	3.6
Ácido acético	-0.23	Heptanona	1.8	Butilbenzoato	3.7
Etoxietanol	-0.22	Dipropiléter	1.9	Metilciclohexano	3.7
Acetato de metilo	0.16	Ácido hexanoico	1.9	Etiloctanoato	3.8
Propanol	0.28	Cloroformo	2.0	Dipentiléter	3.9
Ácido propiónico	0.29	Benceno	2.0	Bencilbenzoato	3.9
Butanona	0.29	Metilciclohexanol	2.0	Decanol	4.0
Hidroxibenciletanol	0.40	Metoxibenceno	2.1	Heptano	4.0
Tetrahidrofurano	0.49	Benzoato de metilo	2.2	Cumeno	4.1
Dietilamina	0.64	Propilbutilamina	2.2	Pentilbenzoato	4.2
Acetato de etilo	0.68	Acetato de pentilo	2.2	Difeniléter	4.3
Piridina	0.71	Dimetilftalato	2.3	Octano	4.5
Butanol	0.80	Octanona	2.4	Undecanol	4.5
Pentanona	0.80	Heptanol	2.4	Etildecanoato	4.9
Ácido butírico	0.81	Tolueno	2.5	Dodecanol	5.0
Dietiléter	0.85	Benzoato de etilo	2.6	Nonanol	5.1
Benciletanol	0.9	Etoxibenceno	2.6	Dibutilftálato	5.4
Ciclohexanona	0.96	Dibutilamina	2.7	Decano	5.6
Propionato de metilo	0.97	Propionato de pentilo	2.7	Undecanol	6.1

Metilbutilamina	1.2	Clorobenceno	2.8	Dipentilftálato	6.5
Acetato de propilo	1.2	Octanol	2.9	Dodecanol	6.6
Cloruro de etilo	1.3	Nonanona	2.9	Dihexilftálato	7.5
Pentanol	1.3	Dibutiléter	2.9	Tetradecano	7.6
Hexanona	1.3	Estireno	3.0	Hexadecano	8.8
Formato de bencilo	1.3	Tetraclorometano	3.0	Diocilftálato	9.6
Feniletanol	1.4	Pentano	3.0	Butiloleato	9.8
Ciclohexanol	1.5	Etilbenceno	3.1	Didecilftálato	11.7
Metilciclohexanona	1.5	Xileno	3.1	Dilaurilftálato	13.7
Fenol	1.5	Ciclohexano	3.2		

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Enzimas

- ◆ Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB, Novozym 435), amablemente proporcionada por la compañía Novo de México, con las siguientes características:
Actividad de 10.000 PLU/g, expresada en unidades de laurato de propilo por gramo. La enzima está inmovilizada en una resina de acrílico y las partículas tienen un diámetro de 0.3-0.9 mm. El contenido de agua es de 1-2%.
- ◆ Lipasa de *Rhizomucor miehei* (Rm, Lipozyme RM 1M), amablemente proporcionada por la compañía Novo de México, sus características son:
Actividad de 150 IUN/g (1 Unidad Novo de Interesterificación es definida como 0.01 w/w% de triestearina convertido/minuto/gramo). La enzima está inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico y las partículas tienen un diámetro de 0.2 – 0.6 mm.

5.2 Sustrato

- ◆ Extracto purificado de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), amablemente proporcionado por Bioquimex-Natural S.A. de C.V. El extracto contiene 80% de ésteres de luteína.

5.3 Materiales y reactivos

- ◆ Acetato de etilo, marca J.T. Baker, grado reactivo analítico (al 99.9%) y grado HPLC (al 100%).
- ◆ Acetona, marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.7%.
- ◆ Acetonitrilo, marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99%.
- ◆ Ciclohexano, marca Reasol, grado reactivo analítico, al 98%.
- ◆ Decano, marca Fluka, grado reactivo analítico, al 98%.
- ◆ Dodecano, marca Merck Schuchardt, grado reactivo analítico, pureza > 99%.
- ◆ Hexano, marca J. T. Baker, grado reactivo analítico (al 95%) y grado HPLC (al %).
- ◆ Isooctano (2, 2, 4-trimetilpentano), marca J. T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.8%.
- ◆ Metanol, marca J.T. Baker, grado HPLC, al 99.9%.
- ◆ Octano, marca Aldrich, pureza 99+%.

- ◆ Tolueno, marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 97%.
- ◆ Acetato de potasio, marca J.T. Baker, con una pureza del 99.5%.
- ◆ Cloruro de litio, marca Sigma, con una pureza del 99%.
- ◆ Cloruro de magnesio, marca Sigma, con una pureza del 98%
- ◆ Nitrato de magnesio, marca Sigma, con una pureza del 98%.
- ◆ Nitrato de potasio, marca Reasol, con una pureza del 99.5%.
- ◆ Yoduro de potasio, marca Mallinckrodt, con una pureza del 100%.
- ◆ Matraces Erlenmeyer de 50 mL con tapón rosca.
- ◆ Placas de sílica-gel.
- ◆ Tamiz molecular marca Sigma con tamaño de poro de 2 Å.

5.4 Equipo

- ◆ Aparato para medir a_w , marca Rotronic.
- ◆ Balanza analítica, marca OHAUS, modelo AP2105.
- ◆ Congelador REVCO, marca Legaci, modelo ULT390.
- ◆ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca Hewlett Packard serie 1100, con bomba cuaternaria, inyección automática y sistema de detección de arreglo de diodos.
- ◆ Incubadora Innova 4330, New Brunswick Scientific con control de temperatura ($\pm 0.1^\circ\text{C}$).
- ◆ Liofilizadora Heto FD 1.0.

5.5 Metodología

5.5.1 Ajuste del a_w

Para ajustar el a_w del disolvente y del biocatalizador se usaron soluciones sobresaturadas de diferentes sales y se siguieron los procedimientos de hidratación conocidos. El valor de a_w en función de la temperatura para las sales usadas se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Variación del a_w en función de la temperatura de las sales usadas (Greenspan, 1971)

Sal	5°C	10°C	20°C	25°C	30°C	40°C	50°C
Cloruro de litio (LiCl)	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.112	0.111
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	0.336	0.335	0.331	0.328	0.324	0.316	0.305
Nitrato de magnesio (Mg[NO ₃] ₂)	0.589	0.574	0.544	0.529	0.514	0.484	0.454
Acetato de potasio (KC ₂ H ₃ O ₂)	---	0.234	0.231	0.225	0.216	---	---
Yoduro de potasio (KI)	0.733	0.721	0.699	0.689	0.679	0.661	0.645
Nitrato de potasio (KNO ₃)	0.963	0.960	0.946	0.936	0.923	0.891	0.848

5.5.1.1 Ajuste del a_w del disolvente

Para valores de $a_w > 0.1$, se colocó en un embudo de separación una solución sobresaturada de la sal preseleccionada y el disolvente degasificado (burbujeando N₂) con el cual se realizó cada reacción. Para alcanzar el equilibrio el disolvente se mantuvo durante 60 horas en contacto con la solución salina y con agitación periódica.

Para valores de $a_w < 0.1$, se agregó una muestra de 20 gramos de tamiz molecular con alta capacidad deshidratante por cada 100 mL de disolvente degasificado durante 60 horas.

5.5.1.2 Ajuste del a_w del biocatalizador

Para valores de $a_w > 0.1$, se colocó una cápsula conteniendo una solución sobresaturada de sal en un desecador. Posteriormente se colocaron 0.1 g de biocatalizador, CALB o Rm, en cada matraz (número de matraces necesarios para monitorear la reacción a varios tiempos dependiendo de la rapidez de la reacción). Para alcanzar el equilibrio el biocatalizador permaneció durante 60 horas al vacío y almacenado a una temperatura de 4°C.

Para valores de $a_w < 0.1$, se colocó 0.1 g de biocatalizador en cada matraz y se almacenaron a -70°C durante una noche previamente a ser liofilizados por 12 horas.

Para cada reacción se utilizó un matraz control, el cual tenía la misma cantidad de biocatalizador previamente inactivado a una temperatura de 120°C por 20 minutos en el autoclave. Esto se hizo con el fin de probar que la conversión observada correspondía a una reacción

enzimática. Al matraz control también se le ajustó el valor de a_w con el procedimiento descrito previamente.

5.5.2 Procedimiento general de la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína

La reacción de hidrólisis de los diésteres de luteína se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se preparó una solución "stock" de diésteres de luteína con una concentración de 0.1 mg/mL. La solución se dividió en muestras de 20 mL y se colocó en los matraces que contenían el biocatalizador (previamente equilibrado a un valor de a_w); cada matraz contenía 0.1 g de biocatalizador/ 20 mL de solución.
- 2) Se colocaron los matraces en la incubadora, cuyas condiciones fueron: 60°C y 130 rpm. La reacción se monitoreó a varios tiempos durante 24 horas.
- 3) Se separó el sobrenadante de la enzima y se extrajo el producto adsorbido en el soporte con un lavado de hexano (2 mL) y varios de acetona (2 mL cada vez). Se juntaron el sobrenadante y el colorante extraído y la solución se llevó a un aforo de 25 mL.
- 4) Se tomaron 2 muestras de 1 mL, se secaron con una corriente de N_2 y se almacenaron a -70°C. Para su análisis en HPLC las muestras fueron redisueltas en 1 mL de metanol-acetato de etilo (70:30); para análisis por cromatografía en capa fina las muestras fueron redisueltas en 1 mL de hexano.

5.5.3 Análisis de muestras

5.5.3.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizó esta técnica de manera cualitativa para monitorear la aparición de productos (monoésteres de luteína y luteína). La fase móvil usada fue hexano-acetato de etilo con composición 70:30.

5.5.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Esta técnica se utilizó para cuantificar la desaparición de los diésteres de luteína y así poder obtener la velocidad inicial de la reacción.

Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Columna: RP₁₈X-Terra, 150 mm x 4.6 mm , D.I. 5 μm.
- Lectura del detector: λ 330nm y λ 446 nm.
- Fase móvil: Metanol - Acetato de etilo (70:30).
- Flujo: 0.8 mL/min.
- Volumen de inyección: 10 μL.
- Temperatura ambiente.

Para determinar la concentración de los diésteres de luteína presentes en las muestras se usaron las condiciones descritas, por lo que se trazó una curva patrón.

La curva patrón fue construida (por duplicado) preparando una solución de 0.16 mg de carotenos/mL de disolvente (hexano), recordando que sólo el 80% del sustrato son xantofilas. Posteriormente se hicieron una serie de diluciones para cubrir el intervalo de concentración en el que se trabajó.

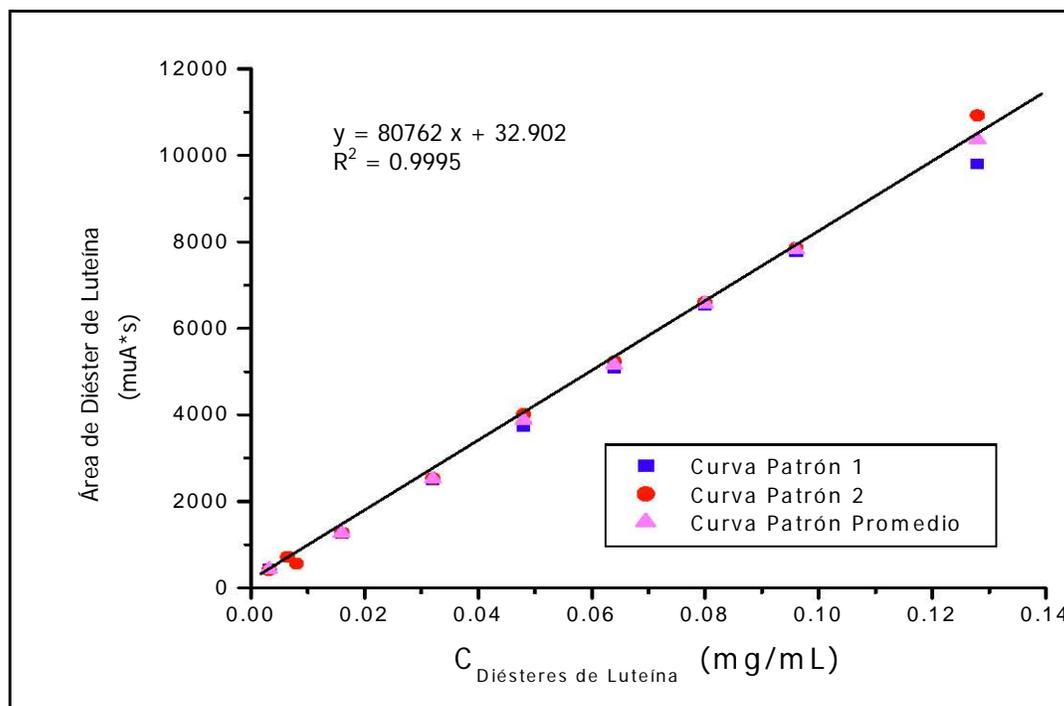


Figura 17. Curva patrón de diésteres de luteína

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Elección de disolventes orgánicos

La reacción de hidrólisis de ésteres de luteína fue evaluada con varios disolventes a varios valores de actividad acuosa (sistema bifásico de reacción). Las propiedades más relevantes de los disolventes empleados se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Propiedades de los disolventes empleados

Disolvente	Teb (°C) ^a	Solubilidad de la luteína (mg/L) ^b	log P ^c
Acetonitrilo	82	100	-0.33
Acetato de etilo	77	800	0.68
Tolueno	110	---	2.5
Ciclohexano	81	50	3.2
Hexano	69	20	3.5
Isooctano	99	---	4.5
Octano	126	---	4.5
Decano	174	---	5.6
Dodecano	216	---	6.6

a. Krstulovic y Brown, 1982

b. Craft y Soares, 1992

c. Harnisch et al., 1983

Los disolventes se eligieron en función del valor de log P con el fin de estudiar el efecto que tiene la variación de la polaridad sobre la reacción. La biocatálisis en disolventes orgánicos es baja en disolventes polares ($\log P < 2$), moderada en disolventes con un valor de log P entre 2 y 4, y alta en disolventes apolares ($\log P > 4$) (Laane et al., 1987). La temperatura de ebullición también fue importante en la elección del disolvente debido a que la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 60°C por ser el óptimo para la enzima.

6.2 Reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de *Rhizomucor miehei*

6.2.1 Reacción en hexano

Resultados previos del grupo de trabajo han demostrado que la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína se puede llevar a cabo en hexano, por lo que los experimentos se llevaron a cabo durante 24 horas a varios valores de actividad acuosa. Las muestras fueron analizadas por la técnica de HPLC y se obtuvieron las áreas de productos y reactivos.

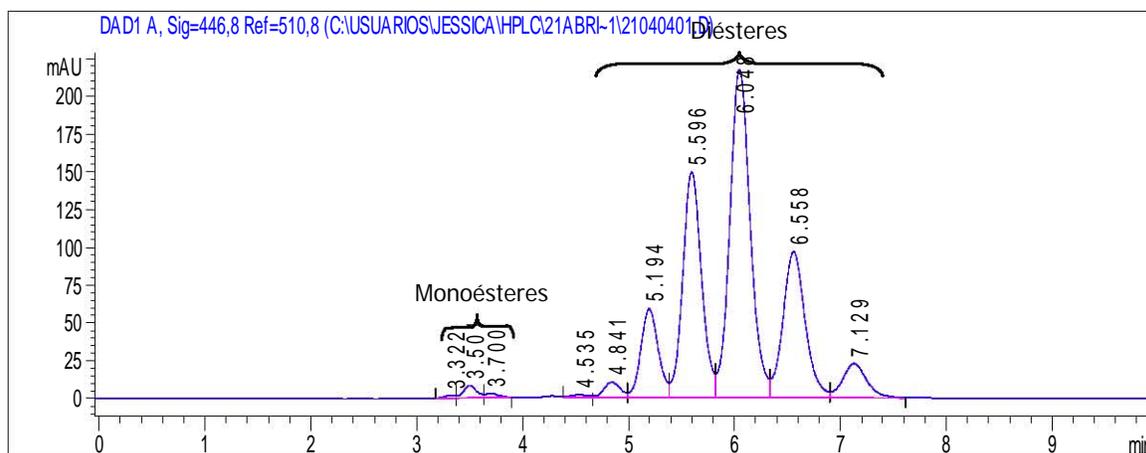


Figura 18. Cromatograma del sustrato en hexano sin lipasa, $t = 0$ horas ($a_w = 0.153$)

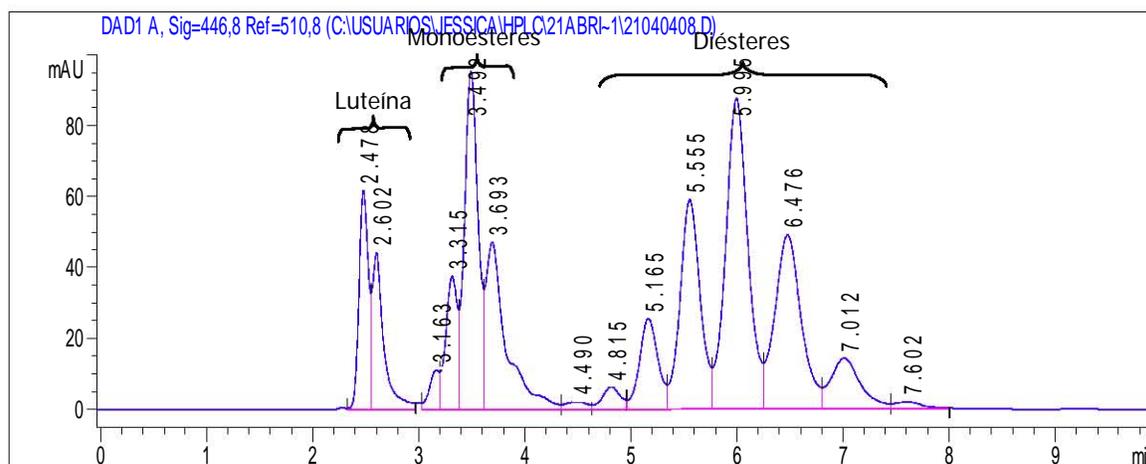


Figura 19. Cromatograma de reacción en hexano con la lipasa de *Rhizomucor miehei*, $a_w = 0.153$ (después de 24 horas)

En la figura 18 se muestra el cromatograma correspondiente al sustrato (diésteres de luteína) en hexano antes de adicionar la lipasa de *Rhizomucor miehei* ($t = 0$ horas), en él aparecen seis picos de los diésteres de luteína con tiempos de retención de 4.5 - 8 minutos, así como 3 picos menores de los monoésteres de luteína con tiempos de retención de 3 - 4 minutos. En la figura 19 se muestra el cromatograma correspondiente a la reacción después de 24 horas, donde se pueden observar los picos de la luteína (cis- y trans-) con tiempo de retención de 2 - 3 minutos, así como los picos de los monoésteres y diésteres de luteína. Claramente se observa una disminución de los sustratos aparejado a la aparición de los productos de la hidrólisis enzimática.

Conociendo las áreas de los diésteres de luteína se obtuvo su concentración para cada valor de actividad acuosa (para saber la concentración de los diésteres existentes en cada muestra se hizo una curva patrón, presentada en la parte experimental). Los resultados se muestran en la figura 20.

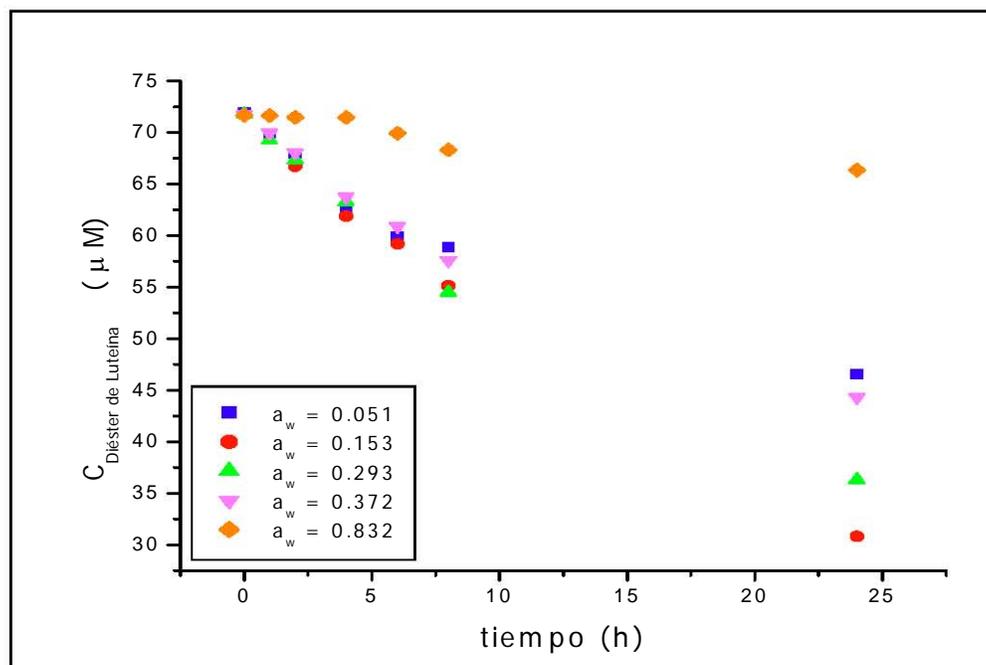


Figura 20. Hidrólisis de los diésteres de luteína en hexano a varios valores de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* (24 horas de reacción)

Con los resultados de la figura 20 y por medio de un ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos a tiempos cortos, se pudo obtener la ecuación para conocer la velocidad inicial (pendiente de la ecuación) de reacción. Los valores de velocidad inicial en función del a_w se presentan en la figura 21.

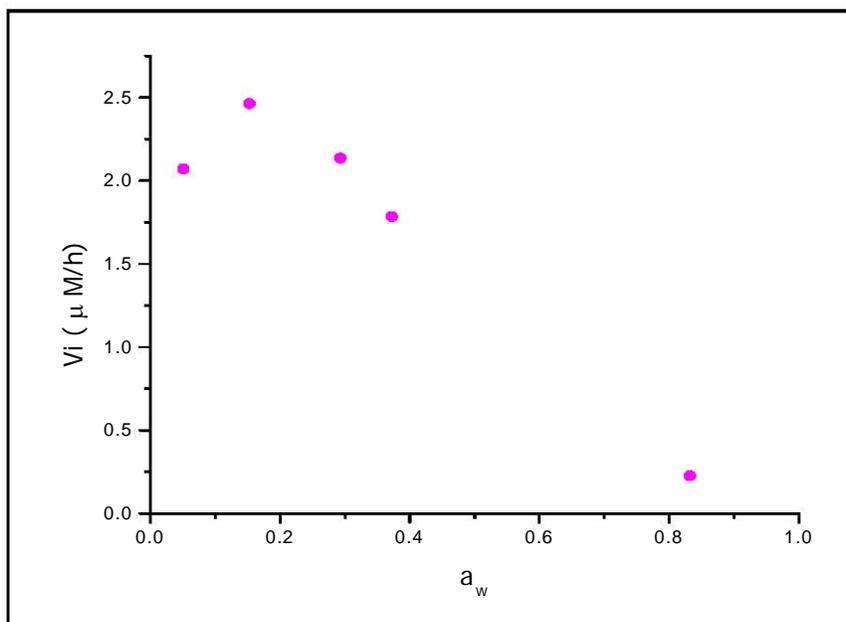


Figura 21. Perfil de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* en hexano

En los resultados anteriores se observó un comportamiento inusual para una reacción de hidrólisis, la cual fue favorecida a bajos valores de a_w obteniendo la máxima velocidad a un valor de 0.153.

6.2.2 Reacción en disolventes con distintos valores de log P

La reacción de hidrólisis de ésteres de luteína se realizó por 24 horas en varios disolventes a un valor de $a_w \approx 0.1$, tomando en cuenta los resultados anteriores en los que se vio que la reacción es favorecida a bajos valores de a_w . Se realizó un análisis cualitativo por TLC (para verificar la existencia de reacción), previo al análisis cuantitativo por HPLC.

En las muestras analizadas por TLC primero eluyen los diésteres de luteína (compuestos menos polares), después los monoésteres y al final aparece la luteína (compuesto más polar). Los valores de los R_f de las especies presentes se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. R_f de las especies presentes en las muestras

Compuesto	R_f^*
Diéster	0.965
Monoéster apolar	0.632
Monoéster polar	0.544
Luteína	0.167

* Disolvente: Hexano

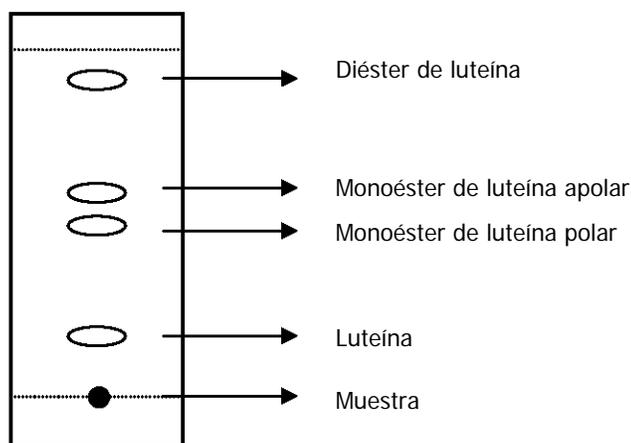


Figura 22. Esquema de las muestras analizadas por TLC

Los resultados de las muestras analizadas por TLC para los disolventes estudiados aparecen en la tabla 12.

Tabla 12. Evaluación cualitativa de la reacción de hidrólisis en disolventes orgánicos para la lipasa de *Rhizomucor miehei* ($a_w \approx 0.1$)

Disolventes	log P	Reacción de hidrólisis
Acetonitrilo	-0.33	✗
Acetato de etilo	0.68	✗
Tolueno	2.5	✗
Ciclohexano	3.2	✓
Hexano	3.5	✓
Isooctano	4.5	✓
Octano	4.5	✓
Decano	5.6	✓
Dodecano	6.6	✓

Con los resultados anteriores observamos que la reacción se llevó a cabo en disolventes apolares y no en disolventes polares. Como se mencionó, esto es atribuible al hecho de que los disolventes polares atrapan parte de la capa esencial de agua alrededor de la enzima, provocando la pérdida de su actividad (Gorman y Dordick, 1992).

Las reacciones fueron evaluadas a las 24 horas y analizadas por HPLC. Los resultados aparecen en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados obtenidos por HPLC para distintos disolventes durante la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de *Rhizomucor miehei* ($a_w \approx 0.1$, $t = 24$ h)

Disolvente	log P	%Área de Luteína	%Área de Monoéster	%Área de Diéster
Acetonitrilo	-0.33	0	1.23	98.72
Acetato de Etilo	0.68	0	2.01	97.99
Tolueno	2.5	0.13	3.37	96.50
Ciclohexano	3.2	4.70	9.43	85.87
Isooctano	4.5	83.94	12.25	3.81
Octano	4.5	23.74	19.37	56.89
Decano	5.6	22.27	17.70	60.03
Dodecano	6.6	22.53	17.46	60.01

Conociendo las áreas de los diésteres de luteína se obtuvo su concentración y por este medio se pudo calcular la velocidad inicial para cada disolvente expresada, por la disminución de los diésteres a tiempos cortos de reacción. Los resultados se reportan en la tabla 14.

Tabla 14. Velocidad inicial de reacción para la lipasa de *Rhizomucor miehei* en distintos disolventes ($a_w \approx 0.1$)

Disolvente	Vi ($\mu\text{M/h}$)
Acetato de Etilo	0.045
Tolueno	0.048
Ciclohexano	0.384
Hexano	2.463
Isooctano	17.11
Octano	2.592
Decano	1.182
Dodecano	1.188

Con los datos obtenidos se determinó que el isooctano es el disolvente más adecuado para esta reacción, debido a que es el que presenta una mayor velocidad inicial de hidrólisis de ésteres de luteína, por lo que se hicieron una serie de experimentos.

Claramente, las diferencias observadas no pueden ser explicadas considerando únicamente los valores de log P (Kumar y Gross, 2000). Se necesita una mayor comprensión de cómo las propiedades del disolvente, los momentos dipolares, la solubilización del sustrato y otros factores influyen en las propiedades catalíticas y fisicoquímicas de las enzimas (Laane et al., 1987).

Aunque las polaridades del ciclohexano y el hexano (3.2 y 3.5, respectivamente) son muy cercanas, la enzima muestra mayor actividad en el segundo que en el primero. Parece ser que además de la polaridad, la estructura molecular de los disolventes también juega un papel muy importante afectando la actividad de la enzima. De manera similar, la velocidad de reacción en isooctano fue mucho mayor que en octano aunque ambos disolventes tiene el mismo log P (4.5). Esto puede sugerir que el disolvente con una estructura ramificada es más adecuado para la reacción enzimática comparado con su contraparte lineal.

6.2.3 Reacción en isooctano

Teniendo como antecedente el hecho de que la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína ocurre en isooctano muy rápidamente y que la conversión de diésteres de luteína a luteína es de más del 80% a un $a_w = 0.153$, ésta se llevó a cabo durante 24 horas a varios valores de a_w . Las muestras fueron analizadas por la técnica de HPLC y se obtuvieron las áreas de la luteína, sus monoésteres y sus diésteres.

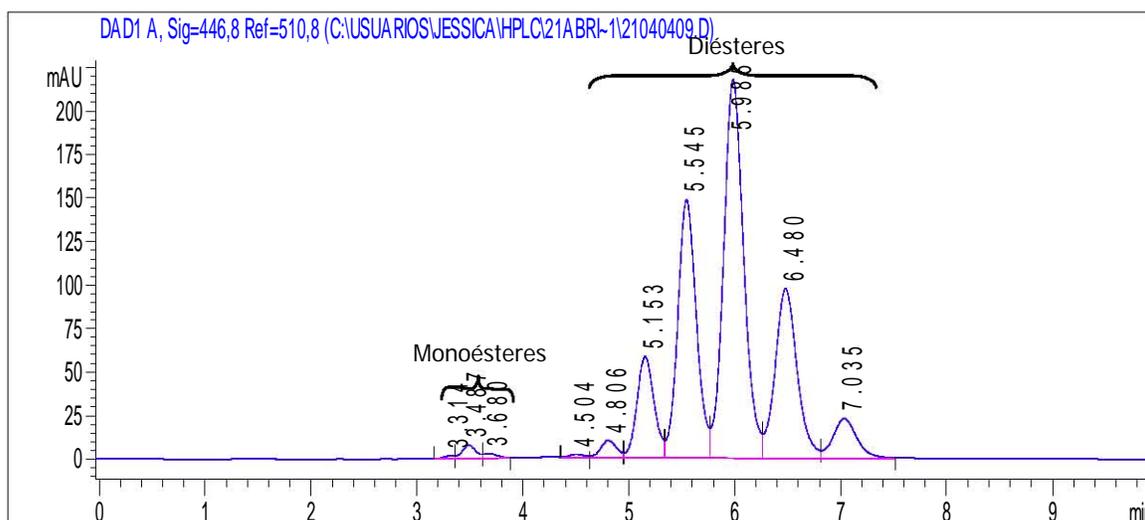


Figura 23. Cromatograma del sustrato en isooctano sin lipasa, $t = 0$ horas ($a_w = 0.153$)

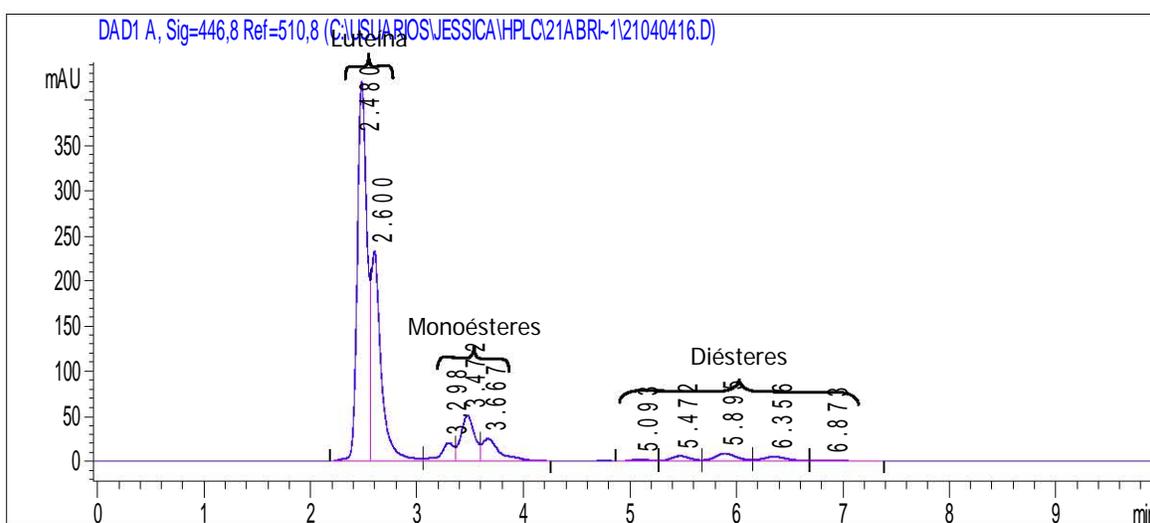


Figura 24. Cromatograma de reacción en isooctano con la lipasa de *Rhizomucor miehei*, $a_w = 0.153$ (después de 24 horas)

En la figura 23 se presenta el cromatograma del sustrato antes de adicionar la lipasa de *Rhizomucor miehei* ($t = 0$ horas), se observan los mismos picos que en la figura 17. En la figura 24 se muestra el cromatograma correspondiente a la reacción en isooctano después de 24 horas, en él se observa que prácticamente desaparecen los diésteres de luteína (picos con tiempo de retención de 4.5 – 8 minutos) para formar en su mayoría *cis*- y *trans*-luteína (con tiempo de retención de 2 - 3 minutos) obteniendo como residuo minoritario los monoésteres de luteína.

Con las áreas de los diésteres de luteína se calculó la velocidad inicial de la reacción para varios valores de a_w . La disminución en la concentración de los diésteres de luteína se presenta en la figura 25.

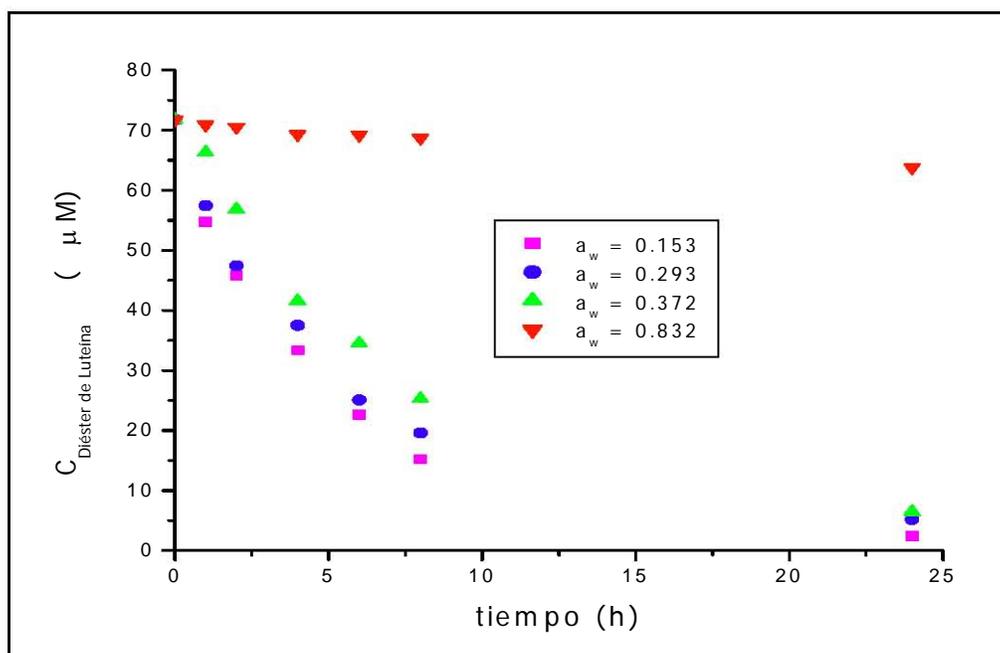


Figura 25. Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* (24 horas de reacción)

Los resultados anteriores muestran que aún a valores muy bajos de a_w la cantidad de agua presente en el sistema fue suficiente para que ocurriera la reacción de hidrólisis y para obtener la conversión de prácticamente el total de los diésteres de luteína hasta luteína después de 24 horas de reacción.

En la gráfica anterior (Figura 25) se puede observar que la disminución en las concentraciones iniciales de los diésteres de luteína no se puede ajustar a una recta debido a que la reacción de hidrólisis es muy rápida en isooctano, razón por la cual se estudió en intervalos de tiempo más cortos y para un mayor número de valores de a_w . Los resultados se muestran en la figura 26.

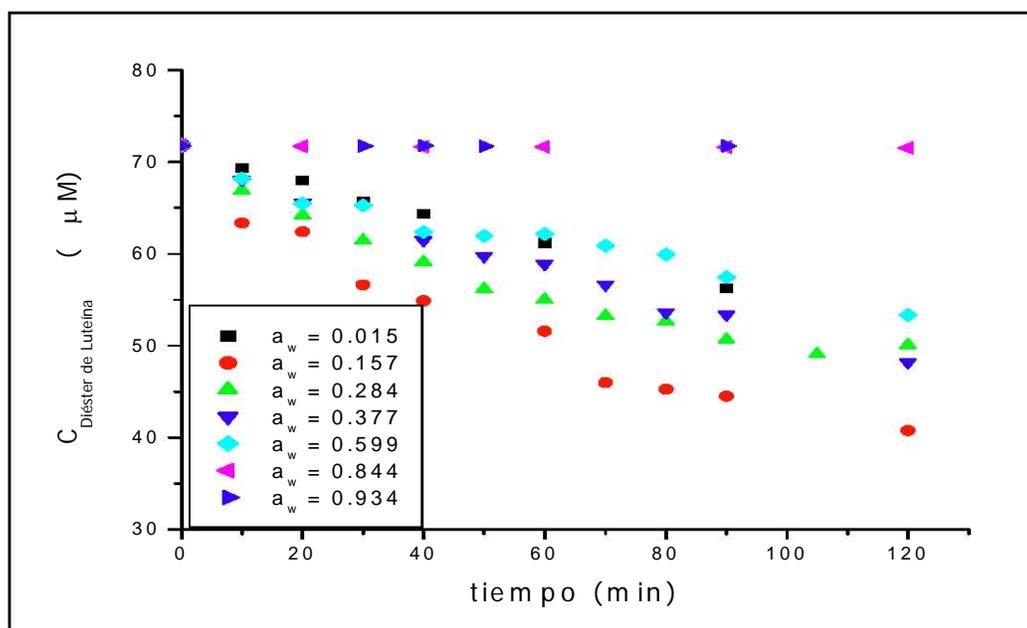


Figura 26. Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* (2 horas de reacción)

Con los datos de la figura 24 se pudo obtener (siguiendo el método anterior) la velocidad inicial de desaparición de los diésteres de luteína; los resultados son reportados en la figura 27. Al igual que para el hexano, la reacción hidrolítica es claramente favorecida a bajos valores de a_w con un máximo de velocidad a $a_w = 0.157$.

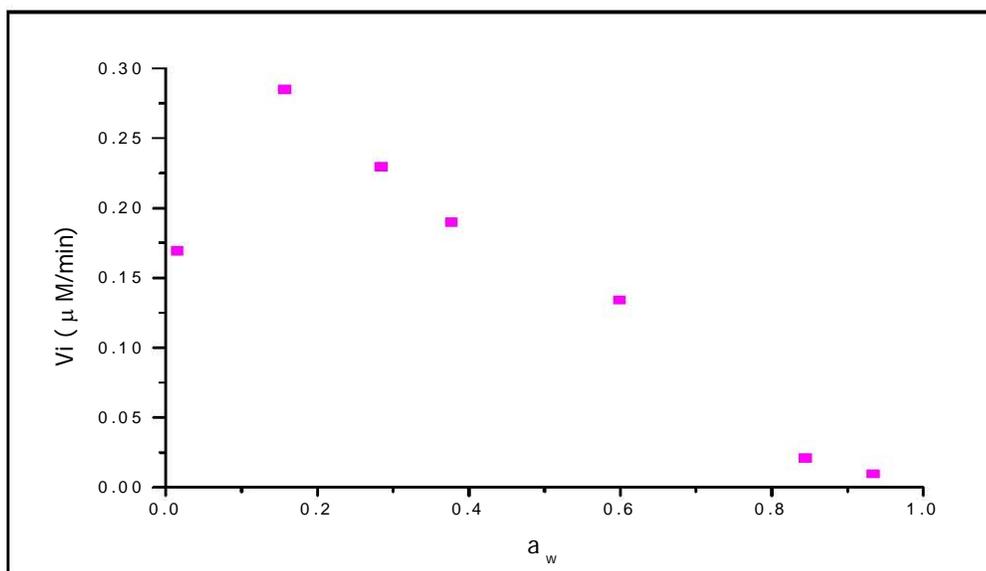


Figura 27. Perfil de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* en isoctano

Con el fin de conocer el número de μmoles de agua que son consumidas durante la reacción para todo el intervalo de a_w (0.1 – 0.9) se empleó una concentración de saturación del sustrato (580 μmol de diésteres de luteína/L de disolvente). Los resultados aparecen en la figura 28.

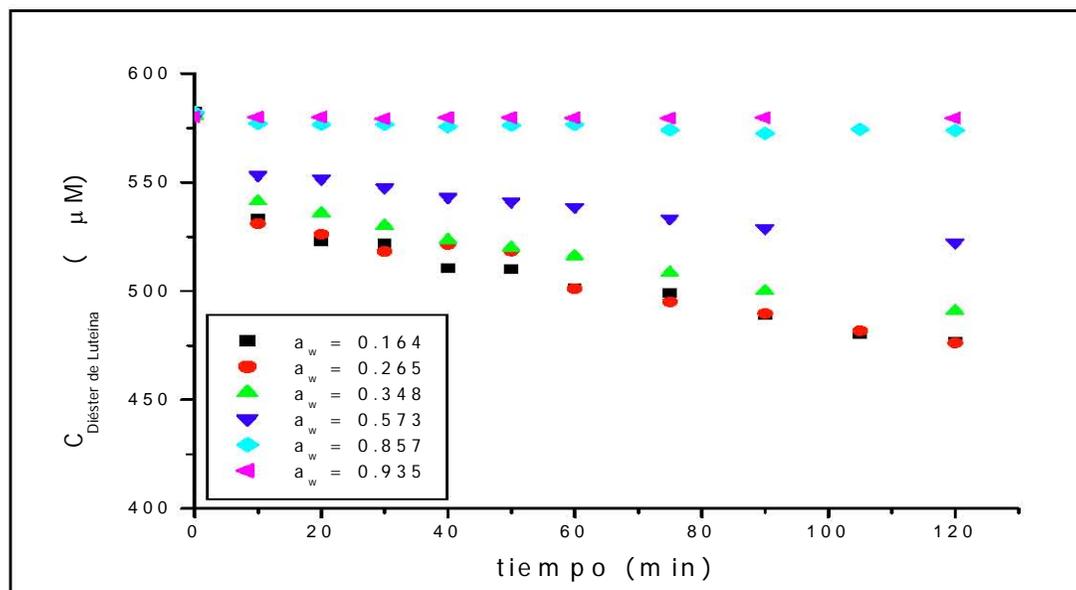


Figura 28. Hidrólisis de los diésteres de luteína en isoctano a varios valores de a_w para la lipasa de *Rhizomucor miehei* (concentración de saturación del sustrato)

Con las áreas de los picos correspondientes a la luteína y sus monoésteres se obtuvo su concentración para cada valor de actividad acuosa (se usó la curva patrón de diésteres, debido a que la luteína y sus monoésteres presentan el mismo cromóforo). Por estequiometría sabemos que se requiere un mol de agua para obtener un mol de monoéster y dos moles para obtener un mol de luteína, de esta manera es posible saber la cantidad de μmoles de agua consumidas durante la reacción de hidrólisis para la lipasa de *Rhizomucor miehei* en isooctano. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. μmoles de agua consumidas durante la reacción de hidrólisis para la lipasa de *Rhizomucor miehei* en isooctano (en función de a_w)

a_w	0.164	0.265	0.348	0.573	0.857	0.935
T (min)	μmol de H_2O consumidas					
0	---	---	---	---	---	---
10	57.000	59.349	44.500	28.959	9.899	5.388
20	70.833	65.931	51.442	31.385	9.849	5.327
30	72.972	74.329	59.682	36.879	10.253	5.479
40	88.155	77.717	68.280	41.917	10.357	4.459
50	87.611	79.149	73.919	45.502	10.698	5.692
60	102.151	100.959	79.403	48.492	11.254	5.850
75	106.715	110.128	90.428	55.750	11.641	5.771
90	119.895	118.017	102.796	65.249	12.464	6.003
105	137.146	130.851	---	---	11.464	---
120	137.690	138.181	117.352	72.103	12.958	6.016

Con los resultados de la tabla 15 se puede observar que a altos valores de a_w la cantidad de μmoles de agua consumidas es mucho menor que a bajos valores de a_w a pesar de existir una mayor cantidad de agua disponible para la reacción. Esto nos lleva a pensar que el agua forma una capa impermeable alrededor del biocatalizador, impidiendo que el sustrato acceda al sitio activo de la enzima.

6.3 Reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de *Candida antarctica*

6.3.1 Reacción en hexano

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con la lipasa de *Rhizomucor miehei* se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa B de *Candida antarctica* en los mismos disolventes probados anteriormente; de la misma manera, se empezó con el hexano para determinar el mejor valor de a_w . Los resultados aparecen en la figura 29.

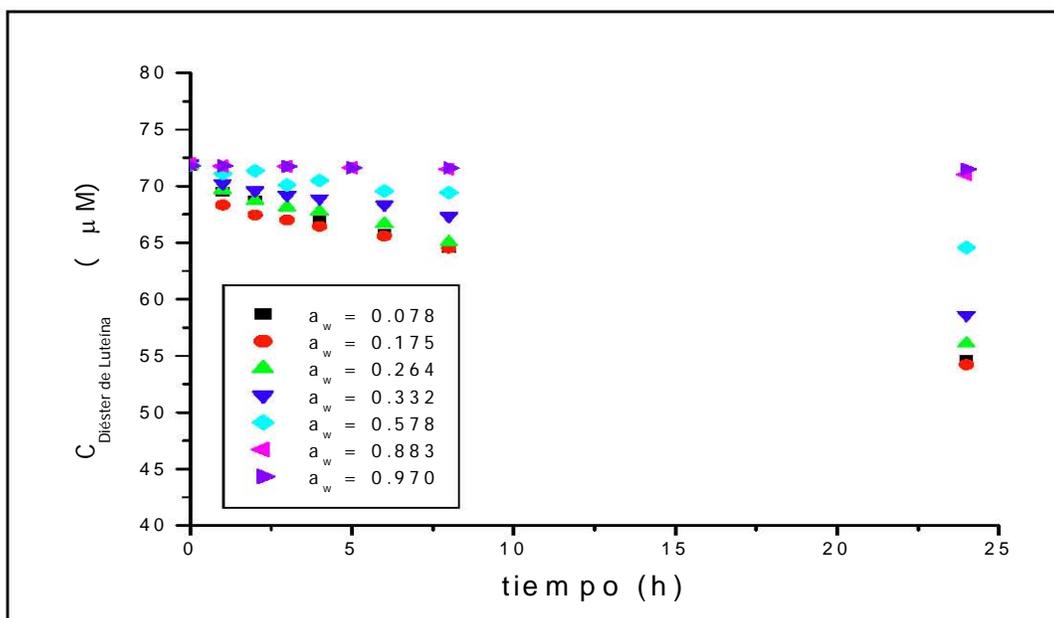


Figura 29. Hidrólisis de los diésteres de luteína en hexano a varios valores de a_w para la lipasa B de *Candida antarctica* (24 horas de reacción)

Con los datos de la figura 29 se pudo obtener la velocidad inicial de reacción de hidrólisis en hexano para la lipasa de *Candida antarctica* en función de la actividad acuosa. Los resultados se presentan en la figura 30 y se observa un perfil similar al obtenido para la lipasa de *Rhizomucor miehei*.

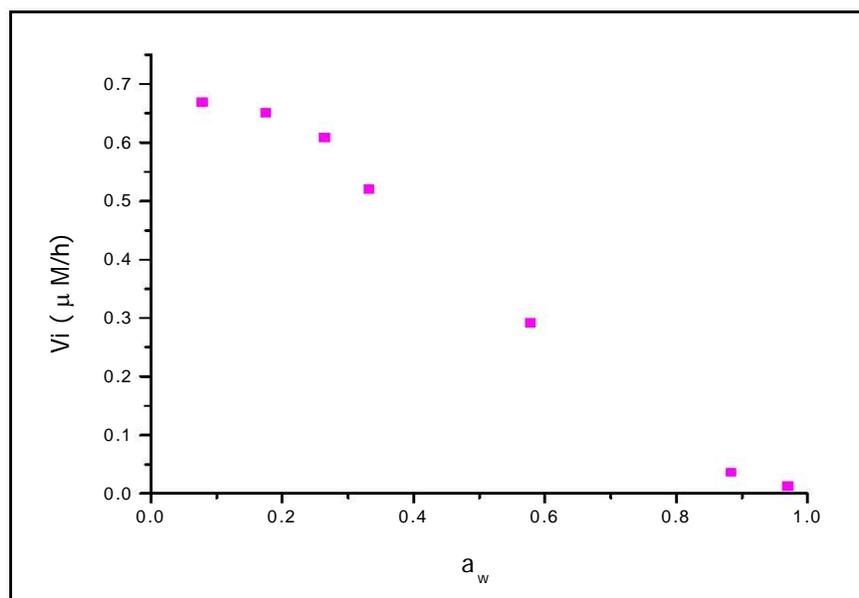


Figura 30. Perfil de a_w para la lipasa B de *Candida antarctica* en hexano

6.3.2 Reacción en disolventes con distintos valores de log P

Sabiendo que el valor óptimo de a_w para la lipasa B de *Candida antarctica* fue alrededor de 0.1, la reacción fue monitoreada durante 24 horas y se observó la desaparición de diésteres de luteína, así como la aparición de luteína y sus monoésteres. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por la técnica de HPLC y se obtuvieron las áreas de los productos y los reactivos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados obtenidos por HPLC para distintos disolventes durante la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa B de *Candida antarctica* ($a_w \approx 0.1$, $t = 24$ h)

Disolvente	log P	%Área de Luteína	%Área de Monoéster	%Área de Diéster
Acetato de Etilo	0.68	0.00	1.28	98.72
Tolueno	2.5	0.00	1.37	98.63
Ciclohexano	3.2	0.22	5.50	94.28
Isooctano	4.5	8.19	31.16	60.65
Octano	4.5	0.00	1.30	98.70
Dodecano	6.6	1.76	16.58	81.66

Conociendo las áreas de los diésteres de luteína se obtuvo su concentración y por este medio se pudo calcular la velocidad inicial para cada disolvente, dichos valores aparecen en la tabla 17.

Tabla 17. Velocidad inicial de reacción para la lipasa B de *Candida antarctica* en distintos disolventes ($a_w \approx 0.1$)

Disolvente	Vi ($\mu\text{M/hr}$)
Acetato de Etilo	0.0027
Tolueno	0.0045
Ciclohexano	0.1348
Hexano	0.6510
Isooctano	1.1931
Octano	0.6206
Dodecano	0.5158

Con los resultados anteriores se determinó que también para la lipasa B de *Candida antarctica* el isooctano ($\log P = 4.5$) es el mejor disolvente para la reacción de hidrólisis.

6.3.3 Reacción en isooctano

Sabiendo que de todos los disolventes estudiados el isooctano es el más adecuado para la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína con la lipasa de *Candida antarctica* y que la conversión de diésteres de luteína a luteína es del 9% a un $a_w = 0.185$, se hicieron una serie de experimentos durante 24 horas a varios valores de a_w . Las muestras fueron analizadas por la técnica de HPLC y se obtuvieron las áreas de la luteína, sus monoésteres y sus diésteres; posteriormente se calculó la concentración de diésteres de luteína presentes en cada muestra. Los resultados aparecen en la figura 31.

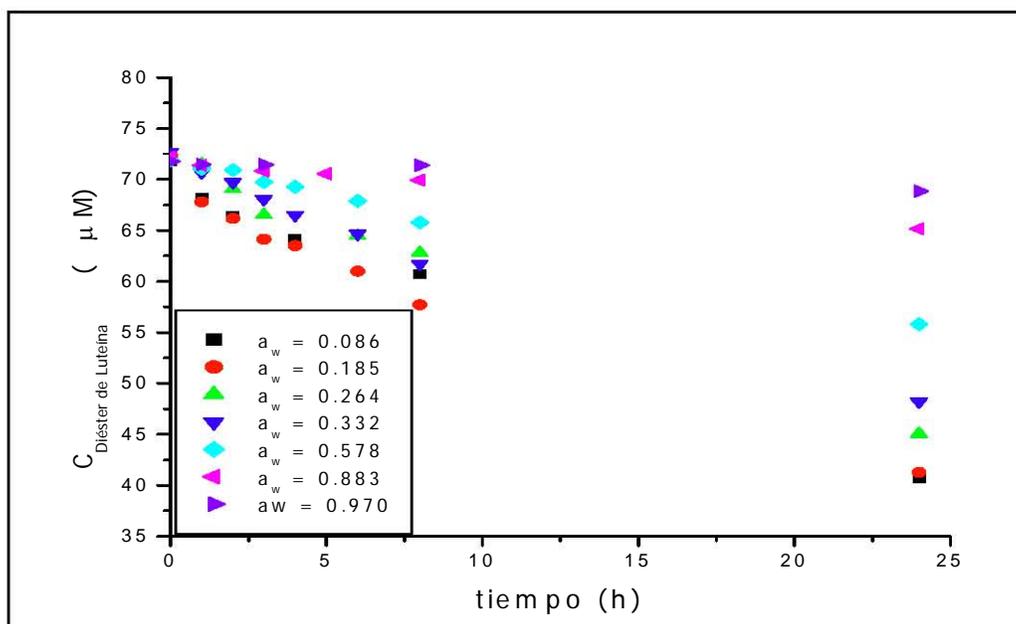


Figura 31. Hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano a varios valores de a_w para la lipasa de *B. Candida antarctica* (24 horas de reacción)

Con los datos obtenidos (Figura 31) se puede observar que la reacción de hidrólisis en isooctano con la lipasa B de *Candida antarctica* no es tan rápida como en el caso de la lipasa de *Rhizomucor miehei*. Con un ajuste de los datos iniciales a una recta, la velocidad inicial de desaparición de los diésteres de luteína fue obtenida y los resultados se reportan en la figura 32.

En la figura 31 también se observa que la mayor velocidad de conversión de los diésteres, se obtuvo a bajos valores de a_w , sin embargo, debe haber suficiente agua en el medio para lograr que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis. Conociendo la reacción de hidrólisis de los diésteres de

luteína sabemos que estequiométricamente debe de haber dos moles de agua por cada mol de diéster para lograr la reacción.

La mayor velocidad de reacción se obtiene con un valor de $a_w = 0.086$, mientras que a altos valores de a_w se obtienen bajos valores en las velocidades reacción lo que representa un ligero corrimiento del punto máximo con respecto a la lipasa de *Rhizomucor miehei* ($a_w = 0.157$).

En una reacción típica, un bajo valor de a_w aumenta la actividad de síntesis para la lipasa B de *Candida antarctica*, mientras que se requieren de valores de a_w más altos para la hidrólisis (Chamouleau et al., 2001). Sin embargo, en la reacción estudiada una cantidad mínima de agua ($a_w < 0.4$ para el biocatalizador y el disolvente) es suficiente para que se lleve a cabo la hidrólisis, mientras que un $a_w > 0.4$ se presenta un exceso que trae como consecuencia un efecto inhibitorio.

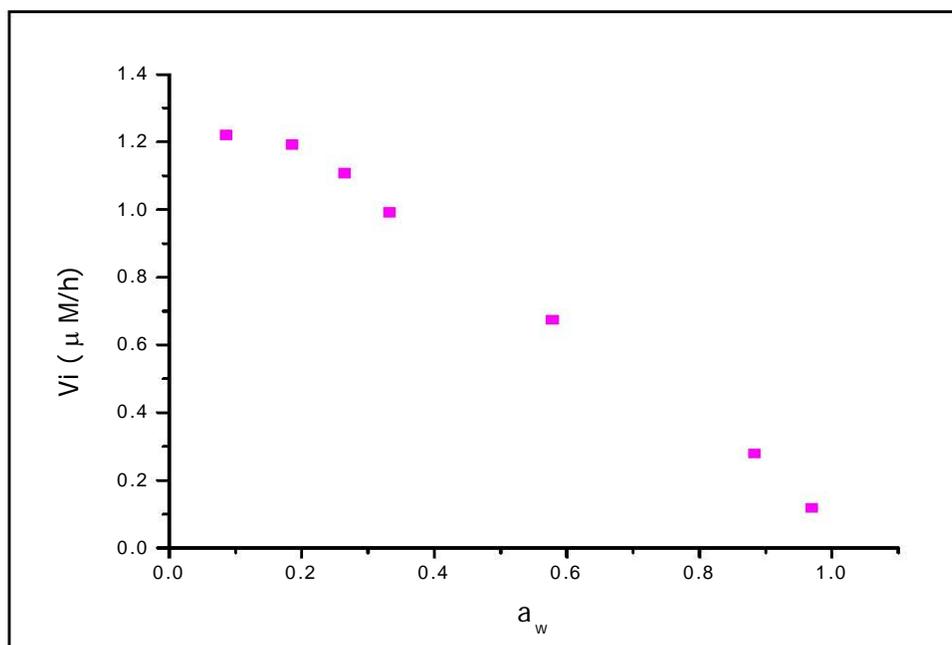


Figura 32. Perfil de a_w para la lipasa B de *Candida antarctica* en isooctano

7. CONCLUSIONES

- La reacción de hidrólisis de ésteres de luteína catalizada enzimáticamente se puede llevar a cabo en varios disolventes orgánicos.
- La lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M) mostró una mayor actividad enzimática con respecto a la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme 435), independientemente del disolvente en la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína.
- Para ambas lipasas se observó mayor velocidad de reacción a bajos valores de a_w . Este perfil se mantuvo para todos los disolventes estudiados; por lo que se puede pensar que el agua en exceso forma una capa molecular alrededor del biocatalizador impidiendo la interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima; esto a pesar de representar una condición que termodinámicamente debe favorecer la reacción de hidrólisis.
- La elección del disolvente es importante, ya que los disolventes polares (debido a su mayor solubilidad en el agua) pueden atrapar el agua esencial de la enzima, provocando una menor actividad catalítica.
- Para ambas lipasas se obtuvieron los mejores resultados de velocidad de reacción y conversión al usar isooctano como medio de reacción.
- La velocidad de reacción de hidrólisis para la lipasa de *Rhizomucor miehei* fue casi 7 veces mayor en isooctano que en hexano, mientras que para la lipasa de *Candida antarctica* fue casi 2 veces mayor.
- La conversión de los diésteres de luteína a luteína para la lipasa de *Rhizomucor miehei* a un $a_w = 0.15$ fue del 84% en isooctano, mientras que en hexano fue sólo del 34% después de 24 horas de reacción.
- Para la lipasa de *Candida antarctica*, la conversión de los diésteres de luteína a luteína fue del 8% en isooctano a un $a_w = 0.09$, mientras que en hexano fue sólo del 3% después de 24 horas de reacción.

- Aunque el isooctano y el octano tienen el mismo valor de $\log P$, la velocidad de reacción y la conversión fue mucho mayor en el primero que en el segundo. Se puede pensar que además de la polaridad, otros factores como la estructura molecular, la solubilización del sustrato y los momentos dipolares afectan la actividad enzimática.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, A., Creger, CR. y Couch, JR. (1968). Petals of Aztec Marigold, *Tagetes erecta*, as a Source of Pigment for Avian Species. **J. Food Sci.**; 33: 635-636.
- Aldercreutz, P. y Mattiasson, B. (1987). Aspects of biocatalyst stability in organic solvents. **Biocatal.**; 1: 99-108.
- Aldercreutz, P. (1991). On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. **Eur. J. Biochem.**; 199: 609-614.
- Alves-Rodrigues, A. y Shao, A. (2004). The science behind lutein. **Toxicol. Lett.**; 150: 57-83.
- Anderson, EM., Karin, ML. y Ole, K. (2000). One Biocatalyst-Many Applications: The use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. **Biocatal. Biotransf.**; 16: 180-204.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, JM. y Sinisterra, JV. (1996). A new method to determine the a_w range in which immobilized lipases display optimum activity in organic media. **Biotechnol. Tech.**; 10 (4): 263-266.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, JM. y Sinisterra, JV. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme Microb. Technol.**; 24: 3-12.
- Baroli, I. y Niyogy, K. (2000). Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. **Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B. Biol. Sci.**; 355: 1385.
- Berglund, P. y Hutt, K. (2000). Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN. Editor. Stereoselective biocatalysis. New York: Marcel Dekker.
- Bone, RA., Landrum, JT. y Tarsis, SL. (1985). Preliminary identification of the human macular pigment. **Vis. Res.**; 25: 1531-1535.
- Bornscheuer, UT; editor. (2000). Enzymes in lipid modification Weinheim: Wiley-VCH.
- Bousquet-Dubouch, MP., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S. y Legoy, MD. (2001). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. **Biochim Biophys. Acta**; 1550 (1): 90-99.
- Breithaupt, DE., Bamedi, A. y Wirt, U. (2002). Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp Biochem Physiol B*: **Biochem. Mol. Biol.**; 132: 721-728.
- Brink, LES. y Tramper, J. (1985). Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. **Biotechnol. Bioeng.**; 2 (8): 1258-1269.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoides in relation to function. **FASEB J.**; 9: 1551-1558.

- Britton, G. y Hornero-Méndez, D. (1997) Carotenoids and Colour in Fruit and Vegetables. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Tomás-Barberán, FA, and Robins RJ, eds., Clarendon Press, Oxford, pp. 11-27.
- Bron, AL., Vrensen, GF., Koretz, J., Maraini, G. y Harding, JJ. (2000). The ageing lens. **Ophthalmol**; 214: 86-104.
- Carrea, G., Ottolina, G. y Riva, S. (1995). Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. **Trends Biotechnol.**; 13 (2): 63-70.
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. y Ghouil, M. (2001). Influence of water activity on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **J. Mol. Catal., B Enzym.**; 11: 949-954.
- Chowdary, GV., Ramesh, MN. y Prapulla, SG. (2001). Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. **Process Biochem.**; 36: 331-339.
- Christen, WG. (1999). Antioxidant vitamins and age-related eye disease. **Proc Assoc Am. Physicians**; 111: 16-21.
- Craft, NE. y Soares JH. (1992). Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β -Carotene in Organic Solvents. **J Agric Food Chem**; 40: 431-434.
- DeFreitas, Z. (2000). Prevalence of lutein Vs. lutein esters in human diets. USDA-NNCC Carotenoid database for U.S. foods, 1998a. Kemin foods, L.C., Des Moines, IA.
- Davies, BH. (1976). "Carotenoids" in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol. 2. TW. Goodwin, ed. 2nd edition. Academic Press
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. (1997). Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles. **J. Agric. Food Chem.**; 45: 1097-1102.
- Fine, SL., Berger, JW., Maguire, MG. y Ho, AC. (2000). Age related macular degeneration. **J. Med.**; 342: 483-492.
- Gacesa, P. y Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Editorial Acribia, S.A. España, traducido por: Castro López-Tarruellas, E., Escrivá Pons, F., Giménez Solves, A., Lorenzo Bolado, M., Martínez Honduvilla C. y Otero Val, S. pp. 1-14, 159-164.
- Gandhi, NN., Sawant, SB., Joshi, JB. y Mukesh, D. (1997). Deactivation of immobilized Lipozyme: Effect of butanol, temperature and water content. **Chem. Eng. J.**; 65: 159-164.
- Gey, KF. (1993). Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. **Br. Med. Bull.**; 49: 679-699.
- Gorman, LA. y Dordick, JS. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnol. Bioeng.**; 39: 392-397.

- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez E. y Blanco, I. (1998). Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. **Br. J. Nutr.**; 80: 445-449.
- Greenspan, L. (1971). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **J. Res. Natl. Stand. A Phys. Chem.**; 81-89.
- Hadden, WL., Watkins, RH., Levy, LW., Regalado, E., Rivadeneira, DM., van Breemen, RB. y Schwartz, SJ. (1999). Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Glower Extract Used as Nutritional Supplement. **J. Agric. Food Chem.**; 47: 4189-4194.
- Halling, PJ., Valivety, RH. y Macrae, AR. (1992) Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. **Biochim. Biophys. Acta**; 1118: 218-222.
- Ham Jr, WT., Muller, HA., y Sliney, DH. (1976). Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. **Nature**; 260: 153-155.
- Harnisch, M., Möckel, HJ. y Schulze G. (1983). Relationship between $\log P_{ow}$, shake-flask values and capacity factors derived from reversed-phase high-performance liquid chromatography for n-alkylbenzenes and some oecd reference substances. **J. Chromatogr**; 282: 315-332.
- Howard, AN., Williams, NR., Palmer, CR., Cambou, JP., Evans, AE., Foote, JW., Marques-Vidal, P., McCrum, EE. y Ruidavets, JB. (1996) Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease?. A comparison between Balfatst and Toulouse. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**; 66 (2): 113-118.
- Huddon, J. (1994). Biotechnological Applications of Research on Animal Pigmentation. **Biotechnol. Adv.**; 12: 49-69.
- Jaeger, KE. y Reetz, TM. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**; 16: 396-403.
- Janssen, PH., Monk, CR. y Morgan, HW. (1994). A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. **FEMS Microbiol. Lett.**; 120: 195-200.
- Johnson, EJ., Hammond, BR., Yeum, KJ., Qin, J., Wang, XD., Catañeda, C., Snodderly, DM. y Rusell, RM. (2000). Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. **Am. J. Clin. Nutr.**; 71: 1555-1562.
- Kazlauskas, RJ. y Bornscheuer, UT. (1998) Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pilher G, Stadler A, Kelly PJW. **Biotechnol.**; 8: 37-192.
- Khachik, F., Bernstein, PS. y Garland, D. (1997). Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.**; 38: 1802-1811.

- Klibanov, AM. (1986). Enzymes that work in organic solvents. **Chemtec**; 16: 354-359.
- Klibanov, AM. (1990). Assymetric transformation catalyzed by enzymes in organic solvents. **Acc. Chem. Res.**; 23: 114-120.
- Klibanov, AM. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. **Trends Biotechnol.**; 15: 97-101.
- Krinsky, NI. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radic. Biol. Med.**; 7: 617, 635.
- Krinsky, NI. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. **J. Nutr.**; 132: 540S-542S.
- Kritchevski, SB. (1999). β -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. **J. Nutr.**; 129: 58.
- Krstulovic, AM. y Brown PR. (1982). Reversed-Phase High-Performance Liquid Cromotography. John Wiley & Sons. Pp 9-13.
- Kumar, A. y Gross, RA. (2000). *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature. **Biomacromolecules**; 1 (1): 133-138.
- Laane, C., Boeren, S., Vos K. y Veeger, C. (1987). Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnol. Bioeng.**; 30: 81-87.
- Landrum, JT. y Bone, RA. (2001). Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**; 385: 28-40.
- Lawrence, BM. (1985). Essential Oils of the *Tagetes* Genus. **Perfum. Flavor.**; 10: 73-82.
- Liese, A., Seelbach, K. y Wandrey, C. editors. (2000). Industrial biotransformations Weinheim: Wiley-VCH.
- Malcata, FX., Reyes, HR., García, HS., Hill Jr, CG. y Amundson, CH. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microb. Technol.**; 14: 426-446.
- Marangoni, A. y Rousseau, D. (1995). Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends Food Sci. Technol.**; 6: 329-335.
- Mares-Perlman, JA., Millen, AF., Ficek, TL. y Hankinson, SE. (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin delaying chronic disease. **J. Nutr.**; 132: 518S-524S.
- Martinelle, M., Holmquist, M. y Hult, K. (1995). On the interfacial activaion of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochim. Biophys. Acta**; 1258: 272-276.
- Mercadante, AZ. (1998). Functions of Carotenoids. **J. Agric. Food Chem.**; 46, 4102-4106.

- Naranjo-Modad, S. (2000). Extracción de carotenoides y otros compuestos por medio de CO₂ en estado supercrítico a partir de *Tagetes erecta*; pp. 17–31. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas.
- Newsome, RL. (1990). Natural and synthetic coloring agents, in: A.L. Branen, P.M. Davidson and Salminen (Eds.), *Food additives*, New York and Basel, pp. 327-346.
- Noonan, J. (1990). In: T.E. Furia (Ed.), *Color Additives in Food*, CRC Boca Raton, pp. 587-616
- Novo Nordisk, Hoja del producto, Novozym 435, Page 1:2 B 606d-GB.
- Novozymes A/S, Hoja del producto, Lipozyme RM 1M, Page 1:2 B 606d-GB.
- Oliver, J. y Palou, A. (2000). Chromatographic Determination of Carotenoids in Foods. **J. Chromatogr., A**; 881: 543-555.
- Omenn, GS., Goodman, GE., Thornquist, MD., Balmes, J., Cullen, MR., Glass, A., Keogh JP., Meyskens, FL., Valarus, B., Williams, JH., Barnhart, S. y Hammar, S. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.**; 334: 1150-1155.
- Philip, T. y Berry, JW. (1975). Nature of Lutein Acylation in Marigold (*Tagetes erecta*) Flowers. **J. Food Sci.**; 40: 1089-1090.
- Philip, T. y Berry, JW. (1976). A Process for the Purification of Lutein-Fatty Acid Esters form Marigold Petals. **J. Food Sci.**; 41: 163-164.
- Reyes, HR. Y Hill, CG. (1994). Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. **Biotechnol. Bioeng.**; 43: 171-182.
- Riddick, JA. y Bunger, WB. (1970). In *Techniques of Chemistry*, Vol 2, 3rd ed. (Wiley, New York) p. 1.
- Rubin, B. y Dennis, EA, editors. (1997). *Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization. Methods in Enzymology*. Vol. 286. New York: Academic Press. pp. 1-563.
- Sharma, R., Chisti, Y. y Banerjee, UC. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**; 19: 627-662.
- Shibamoto, T. y Bjeldanes LF. (1993). *Food additives*, in: S.L. Taylor (Ed.), *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press Inc., San Diego, pp. 156-167.
- Su, Q., Rowley, KG. y Balazs, NDH. (2002). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **J. Chromatogr. B**; 781: 393-418.
- Tafoya, A. y García Hernández, F. (1993). *Colorantes en Biotecnología Alimentaria*. López-Munguía, A., Quintero, R. y García-Garibay, M., eds. Limusa. México.
- Therisod, M. y Klibanov, AM. (1987). Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. **J. Am. Chem. Soc.**; 109: 3977-3981.

-
- Turner, NA., Duchateau, DB. y Vulfson, EN. (1995). Effect of hydration on thermostability of serine esterases. **Biotechnol. Lett.**; 17: 371-376.
 - Turner, NA. y Vulfson, EN. (2000). At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. **Enzyme Microb. Technol.**; 27: 108-113.
 - Tyczkowski, JK. y Hamilton, PB. (1991) Preparation of purified lutein and its diesters from extracts of marigold (*Tagetes erecta*). **Poultry Science**; 70: 651-654.
 - Uppenberg, J., Hansen, MT., Patkar, S. y Jones, TA. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**; 2: 293-308.
 - Volkin, DB., Staubli, A., Langer, R. y Klibanov, AM. (1991). Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**; 37: 843-853
 - Vulfson, EN. (1993). Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. **Trends Food Sci. Technol.**; 4: 209-215
 - Williams, AW., Boileau, TW. y Erdman, JW. (1998). Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**; 218: 106-108
 - Wingerath, T., Sies, H. y Sthäl, W. (1998). Xanthophyll esters in human skin. **Arch. Biochem. Biophys.**; 355: 271-274.
 - Zaks, A. y Klibanov, AM. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 82, 3192-3196.
 - Zaks, A. y Klibanov, AM. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. **J. Biol. Chem.**; 263: 8017-8021.
 - Zang, L-Y., Sommerburg, O. y Van Kuijk, FGJM. (1997). Absorbance Changes of Carotenoids in Different Solvents. **Free Radic. Biol. Med.**; 23, 7: 1086-1089.
 - Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, EKJ., Patkar, SA., Svendsen, A. y Kinnunen, PK. (2001). Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. **J. Biochim. Biophys. Acta**; 1547: 329-338.