



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE AGUA
EN REACCIONES ENZIMÁTICAS DE
ALCOHÓLISIS DE ACEITE DE RICINO EN
MEDIO SUPERCRÍTICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Q.A. BRENDA SÁNCHEZ SALAZAR



TUTOR:
DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Armando Gómez Poyou	Instituto de Fisiología Celular
Secretario	Dr. Jesús Gracia Fadrique	Facultad de Química
Vocal	Dra. Amelia Farrés González Saravia	Facultad de Química
1er. Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química
2o. Suplente	Dr. Ismael Jaimes Bustos	Facultad de Medicina

Sitio donde se desarrollo el tema:

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

Dr. Eduardo Bárzana García

Tutor

Q.A. Brenda Sánchez Salazar

Sustentante

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecerme sus instalaciones y gran acervo de lectura, que me han ayudado a formarme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Eduardo Bárzana García, le reitero mi gratitud por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, su ayuda incondicional, sus enseñanzas y ser una persona íntegra.

A la Dra. Amelia Farrés González Saravia y el Dr. Miguel Costas Basín, por pertenecer a mi comité tutorial y contribuir con su valiosa asesoría.

A los miembros del jurado por sus apreciables consejos, críticas constructivas y ayuda en el mejoramiento de la tesis.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP Convenio 5491-01) por su apoyo brindado para la culminación de este proyecto.

A NOVO de México por proporcionar amablemente el biocatalizador necesario para que se desarrollara el presente trabajo.

A Alejandro porque ha estado conmigo siempre y me ha ayudado durante todo este tiempo en lo personal y lo académico.

A mi mamá por su apoyo incondicional en todos los sentidos y siempre estar conmigo cuando la necesito.

A mi familia por alentarme y ayudar a fundamentar mis principios.

A mis “amigos” del Laboratorio 314, porque sé que será difícil encontrar un grupo de trabajo igual de unido, cooperativo y afable.



ÍNDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos	iii
Índice General	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	x
Resumen	xi
Summary	xii
1. Marco Teórico	1
1.1. Aceite de ricino	1
1.1.1. Obtención del aceite de ricino	2
1.1.2. Usos del aceite de ricino y sus derivados	4
1.2. Reacción de alcoholisis en la producción de ésteres alquílicos	6
1.3. Fluidos supercríticos	7
1.3.1. El dióxido de carbono supercrítico y sus peculiaridades	8
1.4. Lipasas: catalizadores biológicos	10
1.4.1. Características de las lipasas	11
1.4.2. Mecanismo de acción de las lipasas	13
1.4.3. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	13
1.5. Actividad acuosa en catálisis enzimática	16
2. Estado de Arte	19
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo General	21
3.2. Objetivos Particulares	21
4. Hipótesis	21



	Página
5. Metodología	22
5.1. Análisis proximal de las semillas de ricino.	22
5.1.1. Determinación de humedad por gravimetría (<i>AOAC Official Method 925.40</i>).	22
5.1.2. Determinación de extracto etéreo por extracción en Soxhlet (<i>Shahidi, 2001</i>)	22
5.1.3. Contenido de proteína total por método de Kjeldahl (<i>Rhee, 2001</i>).	22
5.1.4. Determinación de cenizas totales (<i>AOAC Official Method 950.49</i>).	22
5.2. Análisis cualitativo del aceite de ricino.	23
5.2.1. Determinación del valor de saponificación (<i>AOAC Official Method 920.160</i>).	23
5.2.2. Determinación del índice de yodo: método de Wijs (<i>AOAC Official Method 920.159</i>).	23
5.2.3. Determinación del índice de acidez (<i>AOAC Official Method 925.41</i>).	23
5.3. Preparación de muestras para el sistema extracción/reacción	23
5.3.1. Pretratamiento de muestras	24
5.4. Sistema con actividad de agua inicial constante.	24
5.5. Sistema extracción/reacción enzimática de ésteres de alquilo	25
5.6. Procesos de derivatización de lípidos para la cuantificación de ácido ricinoleico.	27
5.6.1. Transesterificación ácida para la determinación de ácido ricinoleico total.	27
5.6.2. Silanización con Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) para la determinación de ácido ricinoleico transesterificado enzimáticamente.	27



	Página
6. Resultados y análisis	29
6.1. Caracterización de las semillas de ricino	29
6.2. Caracterización del aceite de ricino extraído de semillas de ricino	29
6.3. Extracción de aceite de ricino en ScCO ₂	32
6.4. Determinación de la cinética de extracción de aceite de ricino en ScCO ₂	34
6.5. Efecto de la actividad de agua en la extracción de aceite de ricino en ScCO ₂	36
6.6. Influencia de la actividad de agua en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂	39
6.7. Efecto asociado al etanol en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂	49
7. Consideraciones finales y conclusiones	52
8. Perspectivas de trabajo	53
9. Anexos	54
10. Referencias	57



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta <i>Ricinus communis</i> .	1
Figura 2. Proceso convencional de extracción de aceite de ricino (<i>Naughton, 1993; Macrae et al., 1993</i>)	2
Figura 3. Porcentaje en peso de ácidos grasos presentes en el aceite de ricino (<i>Kirk-Othmer, 1998</i>)	3
Figura 4. Estructura química fundamental de los triacilglicéridos presentes en el aceite de ricino.	4
Figura 5. Esquema de reacción de la síntesis química de ésteres de alquilo de ácidos grasos.	6
Figura 6. Diagrama de fases para una sustancia pura en función de la temperatura y presión.	8
Figura 7. Esquema general de la reacción de hidrólisis enzimática de triacilglicéridos.	10
Figura 8. Diagrama topológico de la lipasa B <i>Candida antarctica</i> , que muestra su plegamiento de forma α/β -hidrolasa. Las α -hélices se muestran con cilindros y las hojas β con flechas. Se indican las posiciones de los residuos pertenecientes a la tríada catalítica (Programa empleado PDBSum).	12
Figura 9. Mecanismo de reacción de transesterificación catalizado por lipasa (<i>Adaptado de la referencia Marangoni & Rousseau, 1995</i>)	14
Figura 10. Modelo estructural de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> que muestra una ampliación del sitio activo de la enzima (Programa empleado PyMOL).	15
Figura 11. Estadíos de las semillas de ricino (a) Fruto inmaduro; (b) ruto seco, cápsulas dehiscentes; (c) Semilla elipsoide fuera de la valva.	22
Figura 12. Izquierda: Equipo AwQuick A2101 para determinación de actividad de agua de muestras sólidas. Derecha: Sistema utilizado para el pre-equilibrio de muestras con disoluciones salinas sobresaturadas.	24
Figura 13. Diagrama de flujo general del CO ₂ en el sistema SFT-250 (<i>Adaptado del manual de operación</i>)	25
Figura 14. Cromatograma representativo de los derivados de ácidos grasos presentes en el aceite de ricino, determinado mediante cromatografía de gases.	30



	Página
Figura 15. Perfil de ácidos grasos del aceite de ricino extraído por dos métodos a partir de semillas de ricino (Nomenclatura de los ácidos grasos 16:0 Palmítico; 18:0 Esteárico; 18:1 Oleico; 18:2 Linoleico; 18:3 Linolénico; 18:1,OH Ricinoleico)	31
Figura 16. Extracción de aceite de ricino obtenido a partir de las semillas, con respecto a la densidad de ScCO ₂ (Tiempo 2.5 horas)	33
Figura 17. Relación Densidad-Temperatura-Presión del CO ₂ (<i>Taylor, 1996</i>)	33
Figura 18. Efecto de la temperatura en la cinética de extracción de ácido ricinoleico a partir de las semillas de ricino con A _w inicial de 0.6 en ScCO ₂ (350bar de presión y 130rpm).	34
Figura 19. Velocidades iniciales aparentes de extracción de ácido ricinoleico en ScCO ₂ a 350bar y 130 rpm, en función de la temperatura	35
Figura 20. Efecto de la actividad de agua inicial (A _w) en la extracción de ácido ricinoleico en CO ₂ SC a 70°C, 350bar y 130rpm.	37
Figura 21. Velocidades iniciales aparentes de extracción de ácido ricinoleico en ScCO ₂ a 70°C, 350bar, 130rpm, a diferentes valores de actividad de agua inicial.	38
Figura 22. Cinética de extracción de ácido ricinoleico con A _w inicial de 0.015 y 0.748, en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂ a 70°C, 350bar y 130rpm.	40
Figura 23. Rendimiento de extracción de ácido ricinoleico con respecto al A _w inicial del catalizador y sustratos, en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂ , durante 3 horas a 70°C, 350bar y 130rpm.	41
Figura 24. Velocidad inicial aparente de extracción en función de la actividad de agua inicial de sustratos y biocatalizador, en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂ a 70°C, 350bar y 130rpm.	42
Figura 25. Esquema general del tratamiento de silanización de una muestra proveniente de la mezcla, para la identificación del éster etílico de ácido ricinoleico producido vía enzimática.	43
Figura 26. (a) Cromatograma representativo de los derivados silanizados de los componentes presentes en la mezcla de reacción, determinado mediante cromatografía de gases. (b) Cromatograma donde se muestra la separación de los productos cuantificados de las muestras.	44



	Página
Figura 27. Representación gráfica de Cleland del mecanismo de reacción de transesterificación de enlaces éster de triglicéridos de aceite de ricino (E, enzima libre; S, sustrato; A, alcohol; AG, ácido graso; G, glicerol; EEAG, éster etílico de ácido graso)	45
Figura 28. Velocidad inicial aparente de alcoholólisis con respecto a la actividad de agua inicial de sustratos y catalizador en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂ a 70°C, 350bar, 130rpm, 0.083 min.	46
Figura 29. Efecto de la actividad de agua inicial en la reacción de alcoholólisis catalizada por Novozym 435, dentro del sistema extracción/reacción en ScCO ₂ a 70°C, 350bar, 3h y 130rpm.	47
Figura 30. Curva de adsorción de agua para Novozym 435 a 20°C (Adaptada de Chamouleau <i>et al.</i> , 2001)	48
Figura 31. Efecto del etanol en el sistema extracción/reacción en ScCO ₂ con A _w inicial 0.4, 70°C, 350bar, 3h y 130rpm.	50
Figura 32. Representación gráfica de Cleland del mecanismo general de alcoholólisis enzimática y su posible inhibición por etanol.	51
Figura I.A. Curva estándar de éster etílico de ácido ricinoleico obtenida por cromatografía de gases.	54
Figura I.B. Curva estándar del éster etílico de ácido ricinoleico silanizado, obtenida por cromatografía de gases.	54
Figura II.A. Curva estándar de acetato de butilo obtenida por cromatografía de gases (Columna capilar Carbowax 20M, inyector a 110°C y detector FID a 140°C)	55

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Página
Tabla I. Reacciones químicas del aceite de ricino (<i>Adaptada de Kirk-Othmer, 1979 & Ogunniyi, 2006</i>)	5
Tabla II. Puntos críticos de diversas sustancias	9
Tabla III. Algunas aplicaciones de Novozym 435 de interés industrial.	16
Tabla IV. Resultados del análisis químico proximal de semillas de ricino.	29
Tabla V. Propiedades químicas del aceite de ricino	31
Tabla VI. Resultados de la determinación de actividad catalítica de Novozym 435.	56

RESUMEN

El dióxido de carbono supercrítico (ScCO_2) se ha considerado como una alternativa de proceso a la extracción de lípidos por métodos convencionales. Haciendo uso de sus propiedades únicas de disolvente y sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe), se determinaron los parámetros más favorables para la extracción de aceite de ricino a partir de las semillas de ricino, en CO_2 supercrítico (70°C , 350bar, 130rpm). Posteriormente, esas condiciones de trabajo fueron adaptadas a un sistema conjunto de extracción/reacción, donde los triglicéridos del aceite fueron transesterificados con etanol por la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435). Las reacciones se llevaron a cabo con diferentes actividades iniciales de agua (A_w entre 0.015 y 0.9), mediante el pre-equilibrio del catalizador y los sustratos en atmósferas con actividad acuosa controlada, utilizando soluciones salinas saturadas. Se estudió la influencia de la actividad de agua inicial en el sistema, sobre los rendimientos de extracción y de reacción. El análisis de la extracción de aceite de ricino estableció que el etanol, además de haber cumplido su función de sustrato en la reacción de alcoholisis, actuó como cosolvente del ScCO_2 , mejorando la solubilidad del aceite en el fluido y provocando un aumento de la velocidad inicial aparente de extracción de aceite (de $v_i=0.212\text{g AR g}^{-1}\text{ semillas h}^{-1}$ sin etanol, a $v_i=0.809\text{g AR g}^{-1}\text{ semillas h}^{-1}$ con etanol). A partir de evidencias previas, se ha demostrado que las lipasas tienden a ser mejores catalizadores para reacciones de síntesis bajo actividades acuosas reducidas. Sin embargo, la transesterificación es un proceso que sólo consta de una transferencia del grupo acilo y no involucra la formación de moléculas de agua. Por tanto, es un buen modelo de reacción para analizar el comportamiento de Novozym 435 en el sistema con respecto a la actividad de agua. Los resultados muestran un mejor rendimiento de alcoholisis con actividades iniciales de agua entre 0.1 y 0.3 (94.08 y 93.14% de conversión, respectivamente). Conforme el A_w inicial se incrementó, la lipasa disminuyó su actividad de transesterificación (hasta 48.70% de conversión con un $A_w=0.9$), probablemente debido a la participación directa del agua como sustrato en reacciones secundarias de hidrólisis, así como una posible formación de una barrera hidrolítica constituida por capas secundarias de hidratación, que impidieron el paso del sustrato al sitio activo de la enzima.

Palabras clave: lipasa, transesterificación, actividad de agua, fluidos supercríticos.

SUMMARY

Supercritical carbon dioxide (ScCO₂) has been considered like an alternative of process to lipid extraction by conventional methods. Taking into account its unique solvent properties and GRAS substance (Generally Recognized As Safe), we determined the most favorable parameters for oil extraction from castor seeds in supercritical CO₂ (70°C, 350 bar, 130rpm). Those work conditions were adapted to a set system of extraction/reaction, where triacylglyceroles from oil were transesterificated with ethanol by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). The reactions were carried out at different initial water activities (between 0.015 and 0.9). Catalyst and substrates were adjusted to the desired water activity by pre-equilibration under controlled water activities atmospheres, using saturated salt solutions. The influence of initial water activity in the system was studied on the reaction and extraction yields. The analysis of the castor oil extraction in ScCO₂ established that ethanol have a double function in the system, besides to participate like reaction substrate, the ethanol acted like cosolvent of ScCO₂, improving the solubility of oil in the fluid and causing an increase of the initial apparent range of oil extraction (from $v_i=0.212\text{g AR g}^{-1}\text{ seeds h}^{-1}$ without ethanol, to $v_i=0.809\text{g AR g}^{-1}\text{ seeds h}^{-1}$ with ethanol). Previous evidences, has been demonstrated that lipases tend to be better catalysts for synthesis reactions under low water activities. Nevertheless, transesterification is a process which only consists of the acyl group transference and it does not involve a water molecule formation. Therefore, it is a good reaction model to analyze the behavior of Novozym 435 in the system with respect to water activity. The results show a better yield of alcoholysis with initial water activities between 0.1 and 0.3 (94.08 and 93.14% of conversion, respectively). In agreement the initial water activity was increased, lipase diminished its transesterification activity (up to 48.70% of conversion with initial $A_w=0.9$), probably due to the direct participation of water like secondary substrate hydrolysis reaction, as well as a possible formation of an hydrolytic barrier constituted by secondary hydration layers, which prevented the entrance of substrate to the active site of the enzyme.

Key words: lipase, transesterification, water activity, supercritical fluids

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aceite de ricino

El aceite de ricino se deriva de las semillas de ricino provenientes de la planta *Ricinus communis*, perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*. La planta también es conocida como catapucia, higuera, higuera del diablo, planta de castor o palma de Cristo.

El árbol (Figura 1) crece anualmente en regiones tropicales y templadas cálidas alrededor del mundo, como plantas de ornato o de cultivo. Durante la temporada de desarrollo, la planta de ricino requiere temperaturas entre 20 y 26°C y una humedad baja (Naughton, 1993).



Figura 1. Planta *Ricinus communis*.

El fruto en cápsula dehiscente de tres valvas, ovoide, de 1 a 2 centímetros de diámetro, con la superficie cubierta de espinas y de color rojizo antes de la maduración, contiene semillas de forma elipsoide, de 8 a 20 milímetros de longitud, color pardo a rojizo, con jaspeado característico y un peso que va de 0.1 a 1.3 gramos (Rossell & Pritchard, 1991).

La planta de ricino es muy valiosa, ya que de ella se obtiene el aceite de ricino, considerado como uno de los aceites más finos de toda la naturaleza. Los principales productores y exportadores de semilla y aceite de ricino son India, Brasil y China (<http://faostat.fao.org>).

Las estadísticas del año 2000 a la fecha publicadas por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural), indican una producción de 2000 toneladas de ricino, de las 3300 hectáreas de superficie cosechada. A partir de dicho cultivo se derivan 380 toneladas de aceite de ricino, principalmente de diversos municipios de Michoacán y el Bajío (www.sagarpa.gob.mx).

El primer uso del aceite de ricino fue como combustible de lámparas pero en la actualidad tiene cientos de aplicaciones industriales. Por ello, se requiere de mucho esfuerzo para impulsar en el país nuevas tecnologías que aprovechen fuentes renovables para darle un mayor beneficio en la obtención de productos comerciales.

1.1.1. Obtención del aceite de ricino

El proceso general para la extracción de aceite de ricino (Figura 2) a partir de las semillas, consiste en un precalentamiento previo a su trituración en prensa hidráulica. El aceite de ricino obtenido por prensado mecánico es casi incoloro y tiene una baja proporción de ácidos grasos libres.

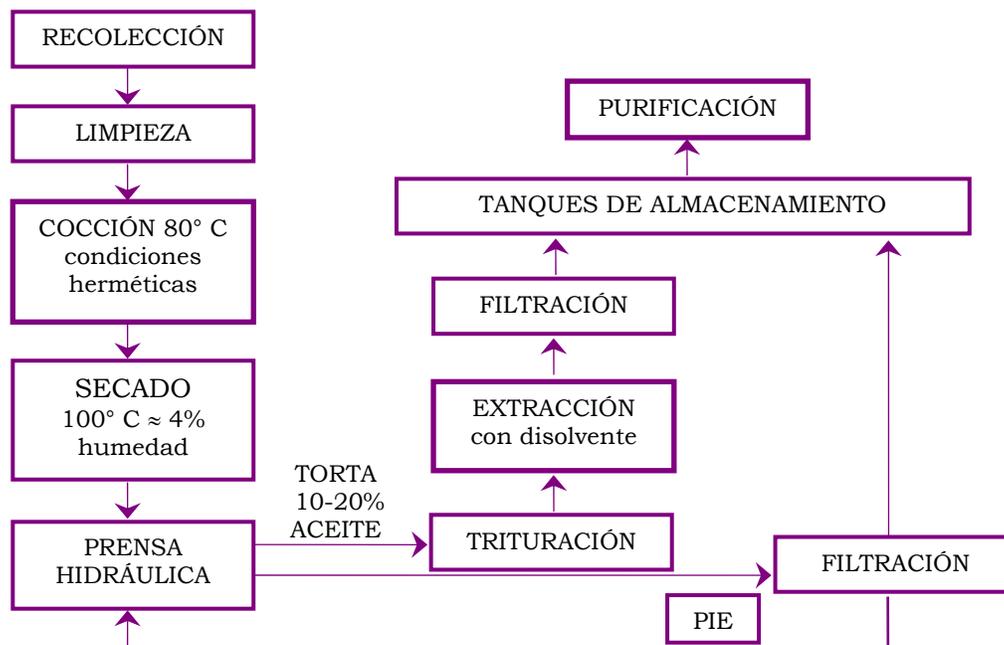


Figura 2. Proceso convencional de extracción de aceite de ricino (Naughton, 1993; Macrae et al., 1993)

La torta prensada contiene entre 10 y 20% de aceite, por lo que requiere de una extracción con disolventes (heptano, hexano o una mezcla de ambos) para recuperar el aceite residual. Esta etapa puede tener efectos desfavorables sobre el producto, ya que la coloración se torna más oscura y puede contener un mayor contenido de ácidos grasos libres (AGL) comparado con el aceite proveniente del prensado (Naughton 1993; Macrae et al., 1993).

Aproximadamente del 45 al 55% del peso de la semilla es aceite, el cual comprende del 87 al 90% de ácido ricinoleico (ácido *cis*-12-hidroxiocetadeca-9-enoico). Esta es la única fuente natural de un ácido graso de 18 carbonos, con una doble ligadura y un grupo hidroxilo (*Kirk-Othmer, 1998*). El resto de los ácidos grasos son similares a aquéllos contenidos en aceites comestibles (Figura 3).

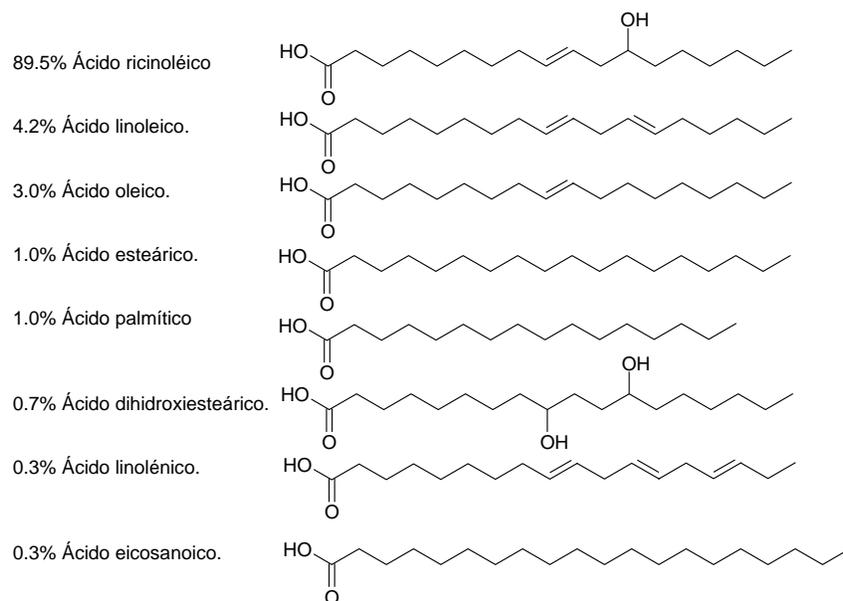


Figura 3. Porcentaje en peso de ácidos grasos presentes en el aceite de ricino (*Kirk-Othmer, 1998*)

Como para otros aceites vegetales, es muy usual que el aceite crudo obtenido por extracción con disolvente o prensado requiera de una refinación para eliminar proteínas tóxicas, gomas y materia extraña. Este refinamiento mejora la coloración, reduce su contenido de ácidos grasos libres y, por tanto, su deterioro durante el almacenamiento. Los procesos de purificación comprenden: desengomado, neutralización, blanqueado, secado, deodorización y algunas veces hidrogenación (*Macrae et al., 1993*).

Químicamente, podría decirse que el aceite de ricino es un triricinoleilglicerol impuro, debido a que se encuentra en mayor concentración (Figura 4). Esto otorga al aceite de ricino propiedades únicas y una versatilidad poco usual. Tiene una densidad relativa más alta que la de un aceite vegetal promedio (≈ 0.96), que es, a su vez, un poco menor a la densidad del agua.

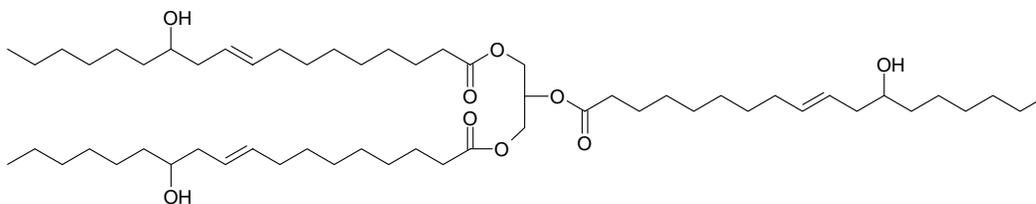


Figura 4. Estructura química fundamental de los triacilglicéridos presentes en el aceite de ricino.

Gracias a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura, puede disolverse en alcoholes en cualquier proporción, pero mejor en alcohol etílico absoluto; también en éter y ácido acético glacial. Tiene una masa molecular promedio de 298 g/mol, un punto de fusión de 5°C y un punto de solidificación entre -12 y -18°C (Kirk-Othmer, 1979).

1.1.2. Usos del aceite de ricino y sus derivados

El aceite de ricino es uno de los productos más comercializados, el cual ha sido utilizado desde la edad media (siglo XVI en Francia) principalmente con propósitos médicos (laxante). Los egipcios también lo usaban contra la caída del cabello y contra las úlceras. El aceite como tal ha sido utilizado en China como aceite de fritura y en la India como adulterante de otros aceites comestibles.

Los enlaces éster, las dobles ligaduras y los grupos hidroxilo, proveen sitios de reacción propicios para la manufactura de derivados empleados principalmente en la industria farmacéutica, cosmética y oleoquímica. La Tabla I refiere las modificaciones químicas que se aplican al aceite de ricino para usos industriales.

Los ésteres alquílicos de aceite de ricino son derivados que han tomado gran importancia en los últimos años, debido a sus diversas aplicaciones. Por ejemplo, son de interés para la elaboración de formulaciones cosméticas o farmacéuticas, gracias a su excelente propiedad emoliente y un olor ligero.

Tanto el ácido ricinoleico como su éster alquílico correspondiente son precursores en la síntesis de triglicéridos de cadena media, los cuales han sido estudiados por su fácil absorción en el cuerpo humano en la obtención de energía. Asimismo, pueden funcionar como sustratos de *Lactobacillus plantarum* en la producción de ácido linoleico conjugado, el cual tiene beneficios fisiológicos de regulación del sistema inmune, antiaterogénico y anticancerígeno (Kishino et al., 2002).

Tabla I. Reacciones químicas del aceite de ricino (*Adaptada de Kirk-Othmer, 1979 & Ogunniyi, 2006*)

Enlace	Reacción	Reactivos añadidos	Tipo de productos	Aplicaciones
Enlace éster	Hidrólisis	Ácido, enzima o catalizador reactivo de Twitchell	Ácidos grasos, glicerol	Industria de cosméticos
	Esterificación	Alcoholes monohídricos	Ésteres	Humectante y emoliente en productos cosméticos
	Alcoholísis	Glicerol, glicoles, pentaeriltriol, etc.	Mono- y diglicéridos, monoglicoides, etc.	Emulsionante; emolientes; aditivos alimenticios.
	Saponificación	Álcalis, sales metálicas más álcalis	Jabones solubles e insolubles	Detergentes espuma
	Amidación	Aminas alcalinas	Sales de amina, amidas	Antiestáticos
Doble Enlace	Oxidación, polimerización	80-130°C, oxígeno, agente entrecruzante	Aceites oxidados y polimerizados	Proporcionan plasticidad a resinas y viscosidad a adhesivos.
	Hidrogenación	Hidrógeno (a presión moderada)	Hidroxiesteratos	Lubricantes de usos múltiples y manufactura de jabones de litio
	Epoxidación	Peróxido de hidrógeno	Epóxidos de aceite de ricino	Estabilizadores y plastificantes de resinas
	Halogenación Reacciones de adición	Cl ₂ , Br ₂ , I ₂ S, ácido maleico	Aceites halogenados Aceites polimerizados	Lubricantes de alta resistencia Plastificantes de resinas
	Sulfonación	H ₂ SO ₄	Aceite sulfonado	Agente de tinción, industria textil como adherente de fibras de poliéster.
Grupo hidroxilo	Deshidratación, hidrólisis, destilación	H ₂ SO ₄ , sales ácidas, óxidos y arcilla activada; 230-280°C	Aceite de ricino deshidratado, ácido octadecadienoico	Industria de revestimientos, lubricantes, lacas, esmaltes y barnices.
	Fusión alcalina	NaOH (250-275°C)	Ácido sebáico	Para uso en la producción de nylon-11 y de lubricantes para automotores y aeronaves
			Alcohol caprílico	Plastificante
			Ácido undecilénico.	Precursor de nylon-11; fungicida y bactericida
	Pirólisis	Temperatura altas (700°C)	Heptaldehído.	Manufactura de saborizantes y fragancias sintéticas
	Halogenación	PCl ₅ , POCl ₃	Aceite de ricino halogenado	Industria de textiles, barnices y como intermediarios oleoquímicos.
	Alcoxilación	Óxido de etileno o propileno y catalizador básico	Derivados etiloxilados o solubles en aceite mineral	Agente emulsionante, antiespumante y antiestático
	Esterificación	Anhídrido acético, -ftálico, -fosfórico, -maléico	Ésteres de alquilo y arilalquilo, ésteres de fosfato	Lubricantes mejorados en oleosidad capacidad de carga y desgaste.
Reacciones de uretano	Isocianatos	Polímeros de uretano	Aislantes; revestimientos de pinturas	
Sulfonación	H ₂ SO ₄	Aceite de ricino sulfonado o aceite rojo turco	Industria textil; antiespumante; emulsionante	

Adicionalmente, los ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos provenientes de aceites vegetales han sido considerados derivados que están en igualdad con diversos productos petroquímicos (biocombustibles, lubricantes, aditivos, etc.). De hecho, son considerablemente superiores puesto que proceden de fuentes biodegradables, renovables y económicas.

1.2. Reacción de alcoholisis en la producción de ésteres alquílicos

La obtención de ésteres alquílicos se consigue mediante una reacción de transesterificación que implica un intercambio de acilo o radicales. Específicamente, la alcoholisis (Figura 5) involucra la reacción entre un alcohol y una molécula de triglicérido (enlaces éster), en presencia de un catalizador ácido o básico para producir los correspondientes ésteres alcohólicos.

El proceso de alcoholisis implica una hidrólisis de los triacilglicéridos (TG) para originar diacilglicéridos (DG), monoglicéridos (MG) y ácidos grasos que sufren una consecuente esterificación alquímica.

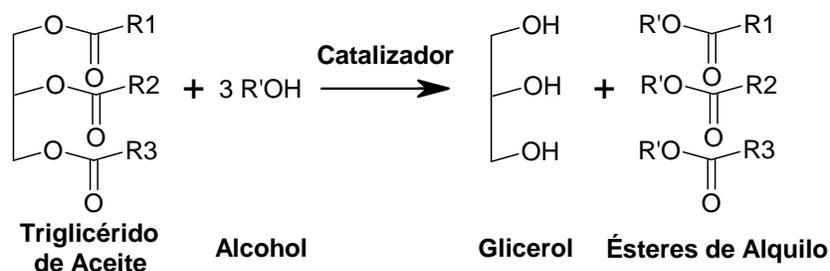


Figura 5. Esquema de reacción de la síntesis química de ésteres de alquilo de ácidos grasos.

A nivel industrial, la transesterificación de aceites o grasas se elabora con alcohol metílico en ambiente básico, utilizando como catalizadores sosa cáustica o metilato sódico, ambos en solución metanólica. Esta vía es actualmente la más empleada ya que es económica, tiene conversiones elevadas (~98%) en tiempos reducidos y es una reacción directa, sin intermediarios. Sin embargo, presenta algunas desventajas, como son el requerir una neutralización del producto, la posterior destilación del exceso de metanol y la purificación de los ésteres metílicos (*Kirk-Othmer, 1998*).

Actualmente, este tipo de metodologías convencionales en las cuales se manejan disolventes orgánicos o catalizadores químicos, son consideradas fuentes generadoras de residuos peligrosos y contaminación ambiental. Por ello, se han buscado tecnologías que puedan ser adaptadas a los procesos comerciales, con la finalidad de proveer alternativas ambientales benéficas. Una de estas técnicas es el aprovechamiento de fluidos supercríticos como disolventes. Desde la década de 1970, el empleo de dióxido de carbono supercrítico (ScCO_2) ha sido comercializado en procesos de descafeinado de café, sustituyendo a disolventes como diclorometano o al dicloruro de etileno. A principios de los 80's diversas compañías se enfocaron a establecer procesos de extracción y purificación de sustancias naturales, biológicas y químicas empleando ScCO_2 como disolvente.

En 1997, la Ford Motor Company cambió algunos de sus procesos de revestimiento de parachoques, del uso de pinturas base-disolvente peligroso al empleo de ScCO_2 (*Wells & DeSimone, 2001*). Recientemente, Micell Technologies ha comercializado un proceso de recubrimiento de fármacos, que consta de una película polimérica continua que encapsula completamente la superficie de los medicamentos. El uso de fluidos supercríticos ha permitido la sustitución de disolventes que afectan al agente terapéutico o la salud humana, tales como tetrahidrofurano o percloroetileno (www.micell.com)

1.3. Fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es una sustancia que se mantiene por arriba de su temperatura y presión críticas (T_c y P_c), que tienen propiedades similares a los gases, en cuanto a su difusividad, y a los líquidos, con respecto a su densidad (*Rizvi, 1994*).

Basados en un diagrama de fases de una sustancia pura (Figura 6), es posible distinguir los tres estados básicos de la materia: sólido, líquido y gaseoso. Éstos están separados por una curva de fusión (equilibrio sólido-líquido), una curva de sublimación (equilibrio sólido-gas) y una curva de vaporización (equilibrio líquido-gas). También, se encuentran dos puntos importantes: el punto triple, que es donde coexisten los tres estados, y el punto crítico, localizado al final de la curva de vaporización. En este último el gas y el líquido se unen para formar una sola fase homogénea-fluida y, más allá de este punto, es donde está la región supercrítica.

Diagrama de fases

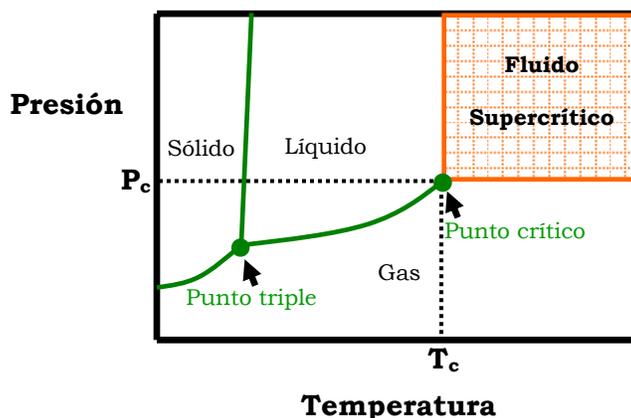


Figura 6. Diagrama de fases para una sustancia pura en función de la temperatura y presión.

Las propiedades fisicoquímicas de un fluido supercrítico varían en función a la presión y la temperatura. Poseen un coeficiente de difusión alto y una tensión superficial menor que la de otros disolventes líquidos, lo que les proporciona una mejor penetración en matrices sólidas. Asimismo, su baja viscosidad favorece la transferencia de masa y, como consecuencia, le brinda un gran poder disolvente (*Luft et al., 2001*).

1.3.1. El dióxido de carbono supercrítico y sus peculiaridades

Existen diversas sustancias puras que pueden ser empleadas como fluidos en su estado supercrítico (Tabla II). Sin embargo, algunas de éstas son difíciles de manejar en las vecindades de su punto crítico, pueden considerarse tóxicas, altamente reactivas o generar mezclas explosivas. El etileno, fluorofomo, dióxido de carbono, etano y hexafluoruro de azufre, son algunos de los fluidos reportados como medio de reacciones enzimáticas porque tienen intervalos de temperatura y presión críticas que no afectan físicamente a las proteínas (*Kamat et al., 1995*).

El ScCO_2 es considerado un fluido atractivo debido a sus características distintivas ya que es inocuo, no inflamable, inerte, benigno ambientalmente y relativamente económico. El CO_2 tiene una temperatura crítica de 31.1°C , que lo hace particularmente útil en la extracción de productos biológicos lábiles. Además, se obtienen productos libres de residuos de disolvente, ya que el CO_2 puede separarse fácilmente por una simple expansión a fase gas (*Sihvonen et al., 1999*).

Tabla II. Puntos críticos de diversas sustancias

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)	Densidad crítica (g cm ⁻³)
Etileno	9.3	50.4	0.22
Xenón	16.6	58.4	1.11
Fluoroformo	26.2	48.6	0.53
Dióxido de carbono	31.1	73.8	0.47
Etano	32.2	48.8	0.20
Óxido nitroso	36.5	72.4	0.45
Hexafluoruro de sulfuro	45.6	37.6	0.73
Difluorometano	78.4	58.3	0.43
Propileno	91.8	46.0	0.23
Propano	96.7	42.5	0.22
Dimetil éter	126.9	52.4	0.26
Amoniaco	132.4	113.5	0.23
<i>n</i> -Pentano	196.6	33.7	0.24
Isopropanol	235.1	47.6	0.27
Metanol	239.5	80.9	0.27
Etanol	240.7	61.4	0.28
Tolueno	318.6	41.0	0.29
Agua	374.2	221.2	0.32

Fuente: Hutchenson, 2002

Estas peculiaridades le dan la ventaja de ser utilizado como medio de extracción, reacción, en tratamiento de materiales, en numerosos procesos industriales e incluso, puede llegar a sustituir procedimientos de purificación y recristalización, en la elaboración de diversos farmacéuticos, nutracéuticos y productos alimenticios.

En lo que se refiere a lípidos, el ScCO₂ es utilizado en tecnologías de extracción, fraccionamiento y transformación química y enzimática. La densidad del ScCO₂ puede variar desde las asociadas con un gas (10⁻³ g/cm³) hasta densidades que exceden la unidad, con una simple alteración de la temperatura o la presión. Este poder disolvente “ajustable” del ScCO₂ es otra de sus propiedades interesantes, ya que le permite extraer selectivamente desde lípidos volátiles hasta compuestos de alto peso molecular, tales como triglicéridos (King, 2002).

Otra manera de extender y modificar la selectividad y solubilidad de compuestos en ScCO₂ se logra mediante la adición de cosolventes. Un cosolvente tiene una volatilidad intermedia entre el compuesto que se extrae y el fluido supercrítico, es miscible con el fluido supercrítico y constituye un porcentaje menor del total de la composición del fluido.

Normalmente, los cosolventes mejoran el poder disolvente del fluido incrementando las interacciones físicas intermoleculares (aumentando la densidad), así como las interacciones químicas específicas con el soluto (mediante puentes de hidrógeno). El agua, metanol, etanol y algunos gases son algunos de los compuestos empleados como cosolventes en la industria (Raventós *et al.*, 2002).

1.4. Lipasas: catalizadores biológicos

Desde los años cincuenta, el ScCO_2 se destinó principalmente para procesos de extracción. A partir de 1985, con los trabajos reportados por Randolph *et al.*, Nakamura *et al.* y Hammond *et al.*, se combinó esta tecnología con procesos de enzimología. Ambas tecnologías originan un bioproceso preponderante, con productos modificados naturalmente y aceptados, tanto por consumidores, como ambientalmente.

Las lipasas (acil-éster-hidrolasas de triacilgliceroles, EC 3.1.1.3) constituyen un grupo diverso de enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de triglicéridos de grasas y aceites, para producir glicerol y ácidos grasos (Figura 7), a partir de dos pasos intermedios de formación de diacilgliceroles y monoacilgliceroles.

Quizás, las enzimas más usadas son las lipasas debido a su buen desempeño en reacciones de hidrólisis, esterificación, aminólisis, transesterificación (interesterificación, alcoholólisis y acidólisis) y enantioresolución de ésteres (Gandhi, 1997). Incluso, estos catalizadores han demostrado tener gran estabilidad y actividad en diversos medios de reacción: acuoso, no acuoso, libre de disolvente, anhidro, fase gaseosa, fluidos supercríticos y líquidos iónicos (Hayes, 2004).

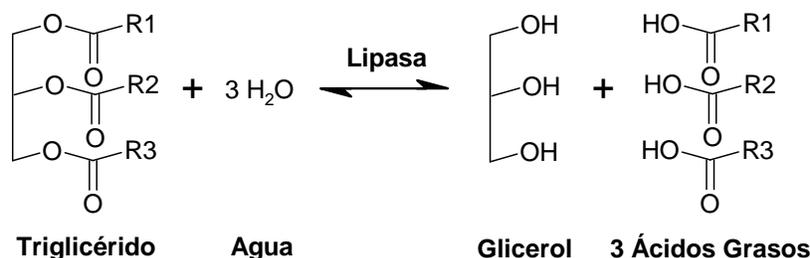


Figura 7. Esquema general de la reacción de hidrólisis enzimática de triacilglicéridos.

Los procesos industriales catalizados por lipasas van en aumento gracias a sus diversas ventajas sobre los catalizadores químicos convencionales. Inicialmente, la Compañía japonesa Miyoshi Oil implementó desde 1981 el proceso para la obtención de jabones a partir la hidrólisis de grasas y aceites, empleando una lipasa de la levadura *Candida rugosa*. Otro ejemplo es la producción de sustitutos de manteca de cacao usando aceite de palma como sustrato y lipasas de *Aspergillus niger* o *Rhizopus japonicus*, desarrollado por las empresas Unilever y Fuji Oil. Ciertas lipasas de la bacteria *Pseudomonas* son aplicadas en la síntesis de fármacos, tal como el hipertensivo Captopril. La síntesis de monoglicéridos empleados como emulsionantes en la industria de alimentos, cosméticos y farmacéutica es uno de los procesos enzimáticos comerciales que está aprobado por la Food and Drug Administration FDA (Kuo & Gardner, 2002).

1.4.1. Características de las lipasas

Las estructuras tridimensionales de diversas lipasas cubren un intervalo de tamaño que va de 15 a 65 kDa de peso molecular (Akoh et al., 2004; Saeed et al., 2005; Vakhlu, 2006) y comparten un motivo estructural común, el cual es un sistema secundario de un plegamiento α/β -hidrolasa (Figura 8). Se han observado más de una conformación que derivan de las condiciones externas.

La inactivación de lipasas por inhibidores de proteasa de serina indica que un residuo de Ser está directamente involucrado en la catálisis. Con base en esta inhibición de actividad las lipasas se han clasificado como hidrolasas de serina (Ollis et al., 1992).

El sitio activo de las lipasas consta de una triada catalítica: un residuo activo de serina (Ser), que actúa como nucleófilo formando el intermediario enzima-acilo; un residuo ácido, que puede ser ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp), y un residuo de histidina (His). Dicha secuencia consenso es el sitio de unión al sustrato, casi siempre está enterrado en la molécula, rodeado por residuos hidrofóbicos y, con frecuencia, bloqueado por una estructura polipeptídica helicoidal y anfifílica (loop, lid o flap), que actúa como cubierta haciendo al sitio inaccesible a disolventes y el sustrato (Schmid & Verger; Yahya et al., 1998). Algunas lipasas presentan activación interfacial, que involucra un reacomodo conformacional del “lid”, que permite el acceso del

sustrato al sitio catalítico (Akoh *et al.*, 2004). A diferencia de la mayoría de las lipasas, CALB es considerada una lipasa atípica, ya que presenta una conformación abierta que expone el sitio activo el medio, lo que hace innecesaria su activación interfacial.

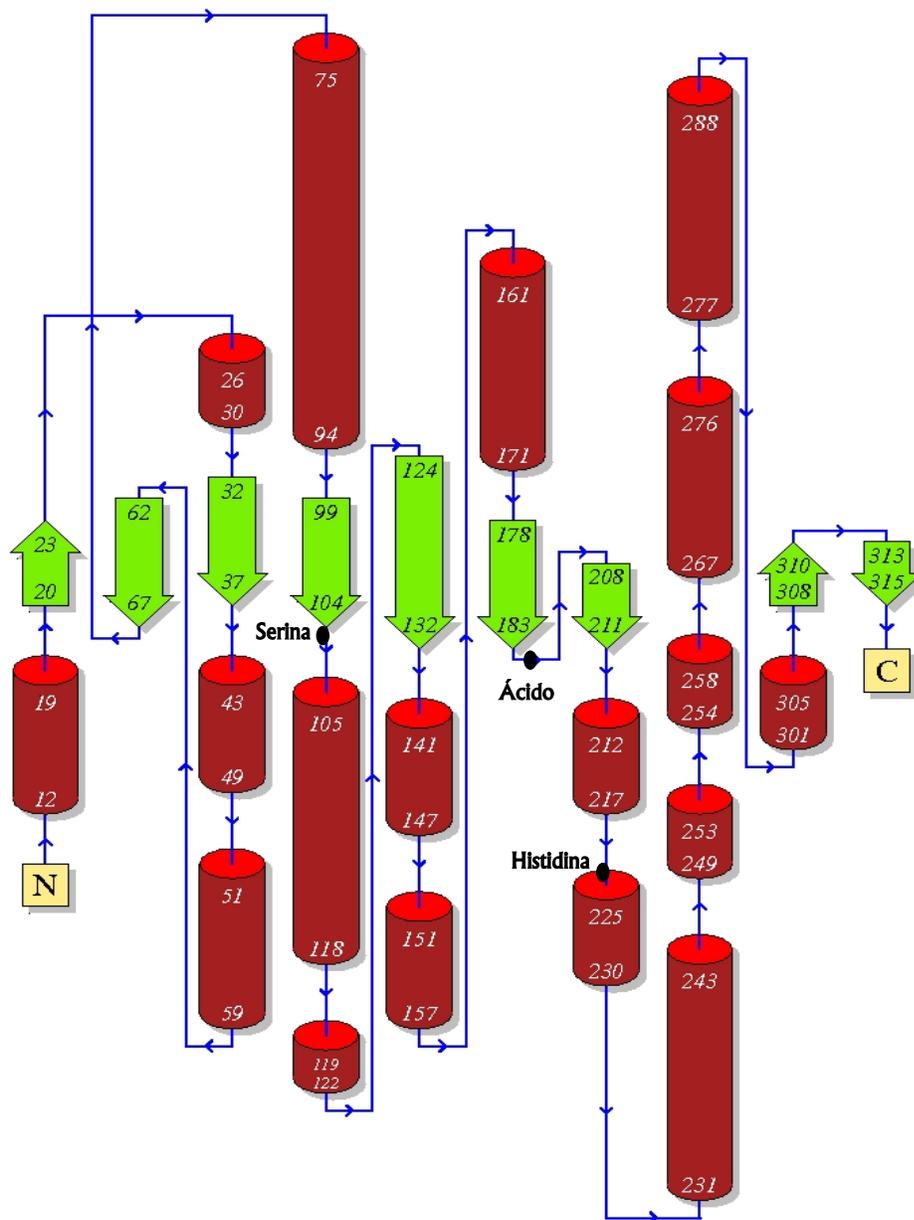


Figura 8. Diagrama topológico de la lipasa B *Candida antarctica*, que muestra su plegamiento de forma α/β -hidrolasa. Las α -hélices se muestran con cilindros y las hojas β con flechas. Se indican las posiciones de los residuos pertenecientes a la tríada catalítica (Programa empleado PDBSum).

1.4.2. Mecanismo de acción de las lipasas

El mecanismo general de catálisis de las lipasas sigue una reacción llamada Bi-Bi Ping Pong (a semejanza del juego de mesa), por la alternancia de entrada y salida de los sustratos y productos de la reacción. El mecanismo químico se considera como reacción de acilación-desacilación del glicérido en el sitio activo (Figura 9).

Las lipasas tienen los residuos de His y Ser próximos al centro activo de la lipasa debido al plegamiento de la cadena peptídica. El residuo de ácido aspártico, que se encuentra en el entorno hidrófobo, puede polarizar efectivamente los grupos funcionales, provocando que la His se transforme en una base fuerte capaz de captar un protón del grupo hidroxilo (-OH) del residuo de Ser. Durante 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. Posteriormente, el anillo imidazol de la histidina se protona estabilizando la carga negativa del residuo ácido 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 se rompe el enlace carbono-oxígeno causando la liberación del alcohol. Durante la reacción, el acilglicerol se mantiene asociado a la serina a través de un enlace covalente. El hidrógeno de la histidina enlaza a la serina y al oxígeno del grupo alcohol saliente. El ataque nucleofílico del agua o el alcohol causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono carbonilo, produciendo un intermediario tetraédrico, el cual sufre un rearrreglo que libera el acilglicerol alterado y regenerando la serina del sitio activo (Reyes & Hill 1993; Marangoni & Rousseau, 1995; Holmquist, 2000).

1.4.3. Lipasa B de *Candida antarctica*

Una de las enzimas que ha demostrado gran versatilidad es la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). Se trata de una α/β -hidrolasa con una cadena polipeptídica de 317 residuos de aminoácido, con peso molecular de 33kDa y punto isoeléctrico de 6.0. Su tamaño aproximado es de 30 X 40 X 50 Å (Uppenberg et al., 1994).

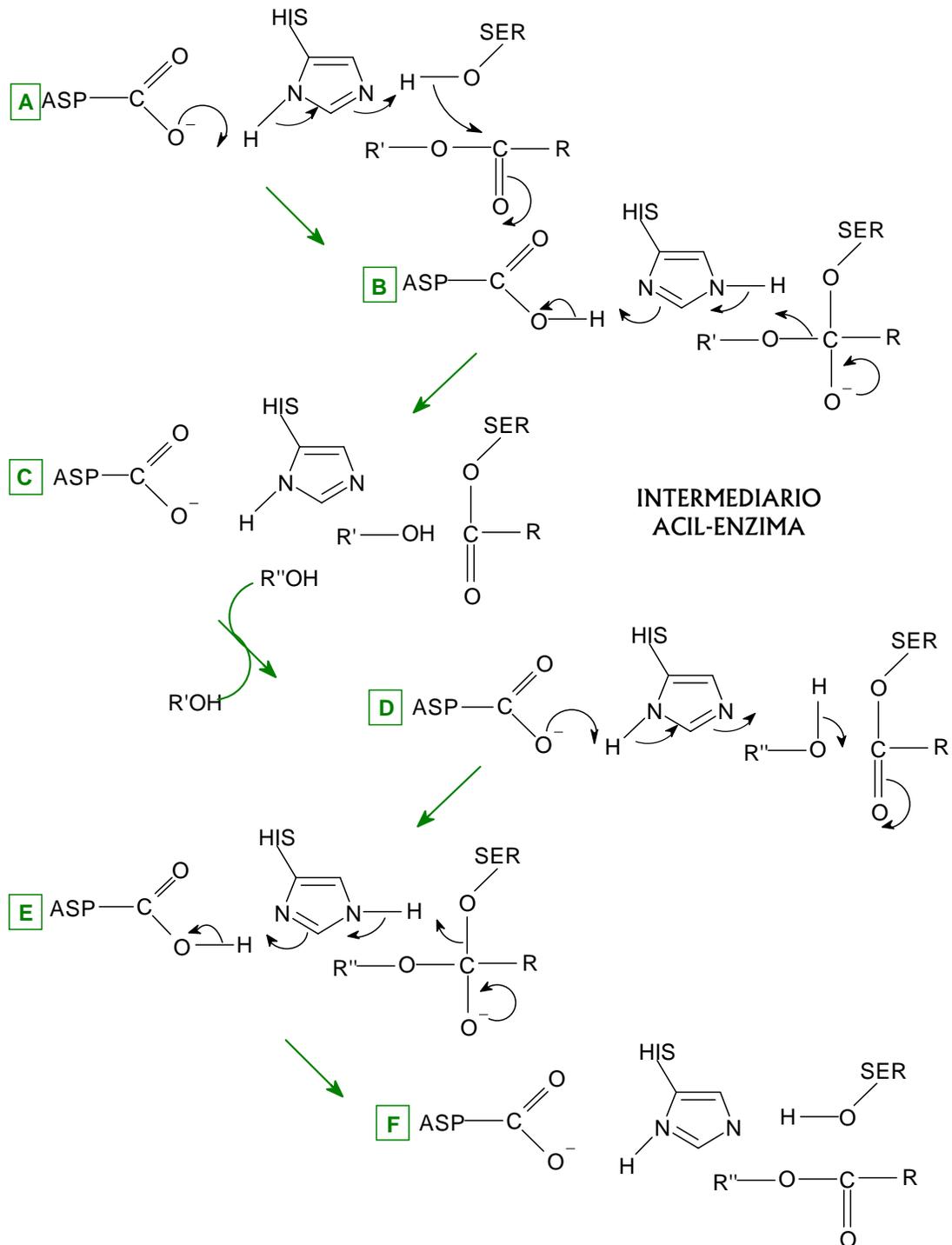


Figura 9. Mecanismo de reacción de transesterificación catalizado por lipasa (Adaptado de la referencia Marangoni & Rousseau, 1995)

La estructura cristalina de esta lipasa denota una superficie hidrofóbica y una tríada catalítica de Ser105...His224...Asp187 en su sitio activo (Figura 10). La molécula presenta una organización que parece estar estabilizada por contactos intermoleculares en una conformación abierta por lo que no requiere de una activación interfacial para ser activa (*Ollis et al., 1992; Uppenberg et al., 1994*). Sin embargo, se ha sugerido que CALB cuenta con una pequeña hélice hidrofóbica ($\alpha 5$) que cumple con las características de un “loop”, pero que forma parte de la superficie de unión al sustrato lipídico (*Martinelle et al., 1995*). La entrada al sitio catalítico de CALB es algo restringida, lo que establece la especificidad del sustrato y el alto grado de estereoespecificidad de esta lipasa (*Schmid & Verger, 1998*).

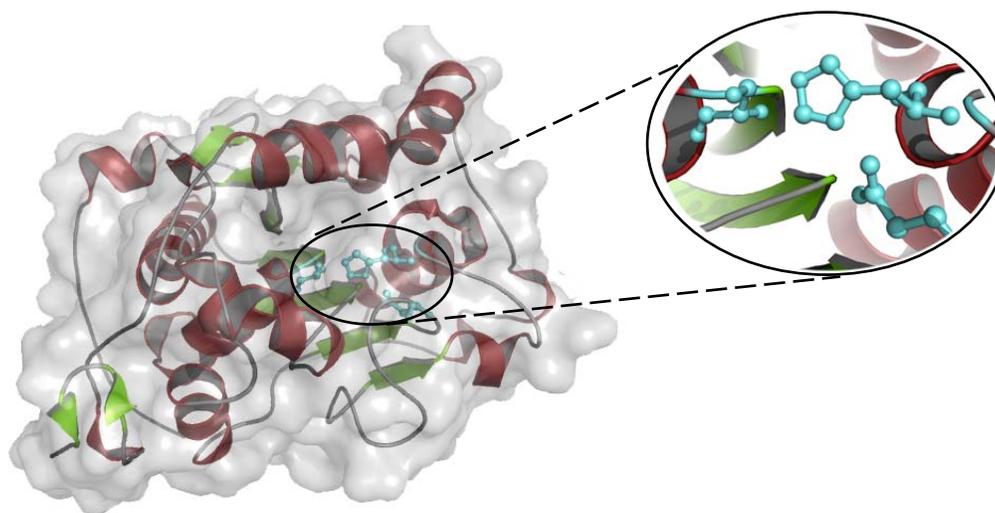


Figura 10. Modelo estructural de la lipasa B de *Candida antarctica* que muestra una ampliación del sitio activo de la enzima (Programa empleado PyMOL).

La falta de estabilidad de ciertas enzimas bajo condiciones de trabajo severas y su difícil recuperación durante el proceso son inconvenientes que se han logrado superar con técnicas de inmovilización de enzimas, favoreciendo procesos biotecnológicos rentables, con mejoras operacionales, técnicas y económicas.

Tal es el caso de Novozym 435, lipasa B de *Candida antarctica* producida por fermentación sumergida del hongo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y adsorbida sobre partículas macroporosas de una resina acrílica (*Novozymes México, 2005*).

Esta lipasa inmovilizada es altamente termoestable y no selectiva, por lo que ha demostrado tener gran versatilidad además de presentar elevada eficiencia catalítica en diversos sistemas. Brunner (*Overmeyer et al., 1999*) demostró una alta estabilidad de Novozym 435, con una actividad máxima a 90°C en ScCO₂. La Tabla III muestra algunas de las reacciones en las cuales este catalizador ha sido utilizado para la obtención de productos de utilidad comercial.

Tabla III. Algunas aplicaciones de Novozym 435 de interés industrial.

Reacción	Sustratos	Producto	Medio	Uso	Referencia
Esterificación	Geraniol Ácido acético	Acetato de geraniol	ScEtano y ScCO ₂	Perfume de cosméticos Aromatizante de alimentos	Peres C, <i>et al.</i> , 2003
Transesterificación (Alcohólisis)	Aceite de semilla de algodón Alcoholes secundarios	Esteres alquílicos de ácidos grasos	Libre de disolvente	Intermediarios de la industria oleoquímica	Köse, <i>et al.</i> , 2002
Esterificación	Etanolamina Ácidos grasos	Ésteres de ácido láurico eritritol	Acetonitrilo	Emulsionante de alimentos	Fernández-Pérez & Otero, 2001
Esterificación enantioselectiva	(R,S)-1-feniletanol y vinil acetato	S-Ibuprofeno	ScCO ₂	Fármaco anti-inflamatorio	Overmeyer <i>et al.</i> , 1999
Interesterificación	Lardo y Aceite de girasol	Grasas plásticas	Hexano	Margarinas untables	Seriburi & Akoh, 1998
Transesterificación (Glicerólisis)	Aceite de soya Glicerol	Mono-glicéridos	ScCO ₂	Aglutinante Emoliente Estabilizador de emulsiones alimenticias	Jackson, <i>et al.</i> , 1997
Transesterificación (Alcohólisis)	Aceites vegetales y grasas Alcoholes primarios	Esteres alquílicos de ácidos grasos	Hexano	Biodiesel	Nelson, <i>et al.</i> , 1996

1.5. Actividad acuosa en catálisis enzimática.

En un sistema no acuoso, la cantidad de agua es limitante y, por tanto, representa un factor importante en las propiedades catalíticas y dinámicas de una enzima. El agua puede estar distribuida entre las diferentes fases del sistema, ya sea disuelta en el disolvente, ligada a la enzima, y asociada a soportes, polímeros u otras sustancias presentes (*Zaks & Klibanov, 1988; Adlercreutz, 1991*).

El modo más común de determinar la cantidad de agua presente en un sistema es calculando la concentración de agua (en términos de % por volumen o molaridad).

Sin embargo, esta medida no refleja el grado de hidratación de la enzima y, por tanto, el efecto real del agua sobre ella.

La actividad de agua (A_w) es probablemente el parámetro termodinámico que caracteriza mejor la hidratación de un sistema y se define de la siguiente manera:

$$A_w = \frac{p}{p_0} = \frac{\%RH}{100} \quad (1)$$

donde p es la presión parcial del vapor de agua presente en el producto, tanto en la superficie como en el interior de su estructura; p_0 es la presión de saturación, o presión del vapor de agua pura a la temperatura del producto; RH es la humedad relativa del ambiente expresada en porcentaje.

El valor de la actividad del agua pura se toma como 1 ($A_w=1$). Con base en lo anterior, los valores de A_w varían desde 1 hasta 0 para un sistema completamente seco (*Bell et al., 1995*). Lo anterior quiere decir que el A_w no es usualmente cercano al valor numérico de la concentración de agua.

En términos termodinámicos, la actividad de agua en equilibrio se define como:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln \frac{f}{f_0} \quad (2)$$

donde μ es el potencial químico del sistema; μ_0 el potencial químico del material puro a la temperatura, T ; R es la constante universal de los gases; T la temperatura (K); f es la fugacidad de un compuesto y, f_0 la fugacidad del material puro.

La actividad de las especies se define como $a = f / f_0$; haciendo referencia al agua, la actividad del agua es:

$$A_w = \frac{f}{f_0} \quad (3)$$

que bajo condiciones de idealidad, la fugacidad se aproxima estrechamente a la presión de vapor ($f \approx p$) tal que:

$$A_w = \frac{f}{f_0} \approx \frac{p}{p_0} \quad (4)$$

El equilibrio entre las fases implica que el potencial químico es el mismo en todas las fases, lo cual permite determinar mediante la fase vapor del sistema, el valor de la actividad del agua de la muestra aún cuando la concentración de agua presente en cada componente sea diferente (*Valivety et al., 1992 y 1994*).

En el caso de las enzimas, su grado de adsorción de agua determina la actividad de agua, que es equivalente al potencial químico y puede dar una indicación directa de la acción de la masa de agua sobre la posición de equilibrio de reacción (*Halling 1994*). El A_w en los medios de reacción catalizados por las lipasas determina la dirección de la reacción hacia la hidrólisis o la síntesis.

Un método simple para alcanzar un A_w igual en los componentes del sistema es pre-equilibrarlos en atmósferas con A_w controlada utilizando soluciones salinas sobresaturadas. Estas soluciones son muy usadas en higrometría debido a que generan una humedad relativa fija de acuerdo a la escala establecida y certificada por la Organización Internacional de Metrología Legal (*OIML R 1221,1996*) y diversas normas estandarizadas como la ISO 483:2005, principalmente, con base en los estudios realizados por Greenspan en 1977.

Trabajar con un A_w fija resulta favorecedor en estudios de catálisis enzimática, de otra manera, los efectos debido a los diferentes niveles de hidratación de la enzima afectan fuertemente su actividad catalítica.

Desde los años 90's, se ha estudiado el efecto del A_w en diversas lipasas y se ha determinado que dicho parámetro no sólo tiene un relación importante sobre su actividad, sino también, una influencia clara sobre la migración de grupos acilo (*Wehtje & Adlercreutz, 1997; Chowdary & Prapulla, 2002*).

2. ESTADO DEL ARTE

La biotransformación de aceites vegetales mediante el empleo combinado de enzimas y fluidos supercríticos ha sido probada con éxito en el desarrollo de nuevos productos, originando bioprocesos con numerosos beneficios además de ser respetuosos del medio ambiente. Para tomar ventaja integral es necesario el estudio de los diversos fenómenos fisicoquímicos que pueden afectar estos sistemas de catálisis.

Como se describe en el marco teórico, el agua es uno de los componentes más importantes de reacciones enzimáticas en medios con bajo contenido de agua, tal es el caso de un sistema que involucra fluidos supercríticos. La cantidad de agua requerida para un buen funcionamiento enzimático depende del soporte de inmovilización, la reacción, la naturaleza del sustrato y el disolvente. Todos estos elementos determinan factores de partición de agua en el sistema y, por tanto, una gran influencia en velocidad y rendimiento de reacción.

De Oliveira (*Lanza et al., 2004; De Oliveira et al., 2004 y 2005*) se ha dedicado al estudio y optimización de la cinética de alcoholisis de diferentes aceites vegetales (entre ellos el aceite de ricino), catalizada por Novozym 435 en medio orgánico y ScCO₂, investigando los efectos de temperatura (entre 30 y 70°C), concentración de agua (0-10% peso), cantidad de enzima (entre 5 y 20% peso), radio molar aceite-etanol (1:3-1:10), presión (entre 70 y 250bar), tiempo de exposición a altas presiones (de 60 a 360min) e intervalos de descompresión del reactor (10-200 kg m⁻³ min⁻¹).

McKeon (*Turner et al., 2004*) se enfocó a la optimización del proceso extracción-reacción de aceite de ricino y metanol en fluido supercrítico. La metanólisis catalizada por la misma lipasa fue evaluada mediante el diseño estadístico Box-Behnken para varios valores de presión (entre 200 y 400bar), temperatura (entre 40 y 80°C), concentración de metanol (entre 1 y 5% volumen), y concentración de agua (de 0.02 a 0.18% volumen).

Muchos de los artículos reportados sobre la dependencia del agua en procesos enzimáticos están referidos a la cantidad y/o concentración de agua. Sin embargo, pocas son las investigaciones publicadas sobre el efecto de la actividad de agua en reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos (*Michor et al., 1996; Almeida et al., 1998; Fontes et al., 2002; Peres et al., 2003*)

Este trabajo presentó la influencia de la actividad de agua inicial sobre el sistema conjunto de extracción de aceite de ricino a partir de semillas de ricino con su consecuente reacción de etanolisis catalizada por Novozym 435, en fluido supercrítico.

3. OBJETIVOS

3.1. General

- Estudiar el efecto de la actividad acuosa inicial sobre el sistema extracción/reacción de alcoholólisis de triglicéridos de aceite de ricino con etanol, catalizada enzimáticamente en dióxido de carbono supercrítico.

3.2. Particulares

- Determinar la composición química de las semillas de ricino, mediante un análisis proximal.
- Caracterizar el aceite de ricino extraído con disolvente orgánico y con dióxido de carbono supercrítico.
- Establecer una densidad favorable del dióxido de carbono supercrítico para la extracción de aceite de ricino a partir de las semillas y su posterior adaptación al sistema extracción/reacción enzimática.

4. HIPÓTESIS

Debido a que el agua tiene la capacidad de actuar como nucleófilo en reacciones de intercambio de grupos acilo, a valores altos de actividad acuosa se favorecerá la hidrólisis catalizada por la lipasa, mientras que a valores bajos de A_w , la lipasa llevará a cabo la reacción de alcoholólisis en dióxido de carbono supercrítico (*Chowdary & Prapulla; Ma et al., 2002*).

5. METODOLOGÍA

5.1. Análisis proximal de las semillas de ricino.

5.1.1. Determinación de humedad por gravimetría (AOAC Official Method 925.40).

El contenido de humedad y materia volátil se determinó por remoción de agua de las semillas homogenizadas colocadas en una cápsula de aluminio previamente mantenida a peso constante. Las muestras se secaron en un horno (Barnstead Internacional Modelo 3608) de vacío (≈ 30 kPa), a una temperatura de 80°C durante 5h. Al finalizar el proceso de secado, la muestra se dejó enfriar 1h en un desecador y se calculó la humedad como el por ciento en peso perdido después del proceso de secado.

5.1.2. Determinación de extracto etéreo por extracción semicontinua de Soxhlet

(Shahidi, 2001). El término extracto etéreo se refiere al conjunto de las sustancias extraídas con éter etílico de una muestra previamente deshidratada. Muestras de semillas de ricino secas y trituradas se colocaron en un aparato tipo Soxhlet. Los constituyentes lipídicos, básicamente grasas neutras y ácidos grasos libres, se extrajeron con éter de petróleo mediante una extracción a reflujo durante 2h. Transcurrido el tiempo de extracción se dejó enfriar la muestra en el matraz y se removió el disolvente a 40°C y presión reducida, con ayuda de un rotavapor (Büchi R-124) equipado con un baño de agua (Büchi R481). La masa de lípido se calculó con el porcentaje en peso del lípido recuperado de la muestra.

5.1.3. Contenido de proteína total por método de Kjeldahl (Rhee, 2001).

Este método se basa en la combustión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrada en presencia de catalizadores metálicos (CuSO_4). El digerido se alcalinizó, se destiló para desprender el amoníaco presente en la muestra, el cual fue atrapado en una disolución de ácido bórico y titulado. El contenido de proteína se calculó con base en el contenido de nitrógeno orgánico.

5.1.4. Determinación de cenizas totales (AOAC Official Method 950.49).

Se pesaron 4g de semillas homogeneizadas y desengrasadas en un crisol tarado previamente y luego se incineró con un mechero de gas. Se colocó la muestra en una mufla eléctrica

con termostato, a una temperatura de entre 525-550°C. Se incineró la muestra hasta que las cenizas adquirieron un color blanco/grisáceo o peso constante. Se pasaron directamente a un desecador y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se pesó la muestra y se calculó el porcentaje de cenizas con respecto al peso inicial de muestra.

5.2. Análisis cualitativo del aceite de ricino.

5.2.1. Determinación del valor de saponificación (AOAC Official Method 920.160).

El índice de saponificación es una medida de los ácidos grasos libres y combinados que existe en el aceite de ricino y es directamente proporcional a su masa molecular (Matissek et al., 1998). El valor de saponificación del aceite representa la cantidad de hidróxido potásico necesaria para neutralizar los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis completa de 1g de grasa.

5.2.2. Determinación del índice de yodo: método de Wijs (AOAC Official Method 920.159).

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes del aceite, por tanto será mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de lípidos. Se define como la cantidad en g de yodo (referidas al yodo elemental) que resulta ligada por cada 100g de grasa o ácidos grasos.

5.2.3. Determinación del índice de acidez (AOAC Official Method 925.41).

El índice de acidez es una medida del contenido en ácidos libres presentes en lípidos y ácidos grasos. Al contrario que en la determinación del índice de saponificación no se determinan los ácidos ligados. El valor de acidez representa la cantidad en mg de hidróxido potásico necesaria para la neutralización de los ácidos grasos libres presentes en 1g de aceite.

5.3. Preparación de muestras para sistema extracción/reacción.

Las semillas recolectadas de la planta de ricino seca, se desenvainaron y pelaron (Figura 11), para posteriormente ser almacenadas en ultracongelación a -70°C.

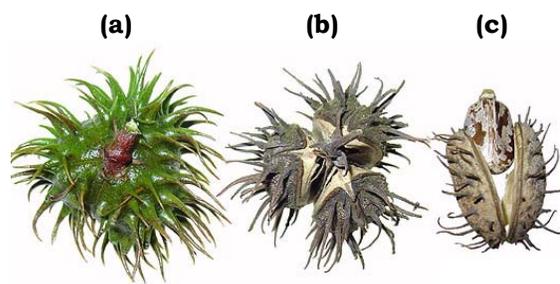


Figura 11. Estadios de las semillas de ricino (a) Fruto inmaduro; (b) Fruto seco, cápsulas dehiscentes; (c) Semilla elipsoide fuera de la valva.

5.3.1. Pretratamiento de muestras. Antes de iniciar cada proceso, las semillas se atemperaron durante 30min y posteriormente se homogenizaron en un mortero con pistilo. Una vez trituradas, se pesaron 5g de semillas dentro de una bolsa de papel poroso y se congelaron nuevamente durante 5 horas a -70°C . Después de este período, las semillas se liofilizaron durante 3h (Heto Modelo FD1.0 CT 60e) equipado con una bomba de vacío (Vacuubrand Modelo RZ 2). Al finalizar, las muestras de semillas se acondicionaron a la actividad acuosa requerida. La lipasa comercial Novozym 435 fue donada por Novo de México. En una bolsa de papel poroso se pesó 1g de catalizador y se sometió al mismo procedimiento de congelación, liofilización y pre-equilibrio de la A_w con disoluciones salinas saturadas. El etanol utilizado en el sistema extracción/reacción se puso en contacto directo con un agente desecante (tamiz molecular de 3\AA , en forma de pellets de 1.6mm, Aldrich) durante 48h con la finalidad de alcanzar un nivel bajo de humedad. Posteriormente, las muestras de alcohol etílico se pre-equilibraron a las diferentes actividades acuosas.

5.4. Sistema con actividad de agua inicial constante. El efecto del agua se estableció llevando a cabo el proceso de extracción/reacción controlando la actividad acuosa inicial. El biocatalizador al igual que los sustratos, se pre-equilibraron durante 48h a 25°C , dentro de un desecador sellado al vacío, a la actividad acuosa requerida para cada experimento. El desecador contenía en el fondo la disolución salina saturada que generaba una atmósfera de humedad relativa conocida, según las referencias de *Halling, 1994 & Current Protocols, 2001*.

Las soluciones salinas saturadas usadas fueron las siguientes: LiCl ($A_w=0.113$), MgCl_2 ($A_w=0.328$), K_2CO_3 ($A_w=0.432$), NaNO_2 ($A_w=0.610$), NaCl ($A_w=0.753$) y KNO_3

($A_w=0.936$). La actividad acuosa inicial menor ($A_w\approx 0.015$) se logró después de haber sometido las muestras a un proceso de liofilización.

Para comprobar que las muestras habían alcanzado la actividad acuosa definida durante el período de acondicionamiento, se pre-equilibró un duplicado de la muestra a la cual se le determinó su actividad de agua con el equipo A_w Quick (Modelo A2101 de Rotronic Instrument Corp.). Este dispositivo cuenta con una sonda de AwVC de Humedad-Temperatura, mecanismo acoplado, que consta de un sensor capacitivo de humedad (Rotronic Hygromer™ C94) y un sensor de temperatura (Pt100 RTD). Por tanto, la relación entre la cantidad de humedad relativa detectada por el sensor capacitivo, en función de la temperatura, proporcionan una medida de la actividad de agua de la muestra (Figura 12).



Figura 12. Izquierda: Equipo AwQuick A2101 para determinación de actividad de agua de muestras sólidas. Derecha: Sistema utilizado para el pre-equilibrio de muestras con disoluciones salinas sobresaturadas.

5.5. Sistema extracción/reacción enzimática de ésteres de alquilo. El biocatalizador (1g), las semillas trituradas (5g) y el etanol (7% del volumen total del reactor), previamente pre-equilibrados a una A_w determinada, se introdujeron en un reactor de alta presión modelo SFT-250 (Supercritical Fluid Technologies, Inc.) de 500mL de capacidad y calentado a 70°C de temperatura. Una vez cerrado, el reactor fue alimentado con dióxido de carbono con ayuda de una bomba de líquidos impulsada con aire proveniente de un compresor de aire hasta una presión de 350bar. La reacción se consideró iniciada cuando la presión del sistema se alcanzó. Con ayuda de un “muestreador” de 2mL, se tomaron muestras de la mezcla de reacción en intervalos de tiempo de 15min

para estudiar el desarrollo del proceso. El muestreador se sumergió en un baño de hielo durante 5min e, inmediatamente después, se despresurizó burbujando el CO₂ en 10mL etanol contenido en un matraz Erlenmeyer de 25mL y el muestreador se lavó con 5mL del mismo disolvente. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 5mL, eliminando el etanol bajo atmósfera de nitrógeno. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis cromatográfico.

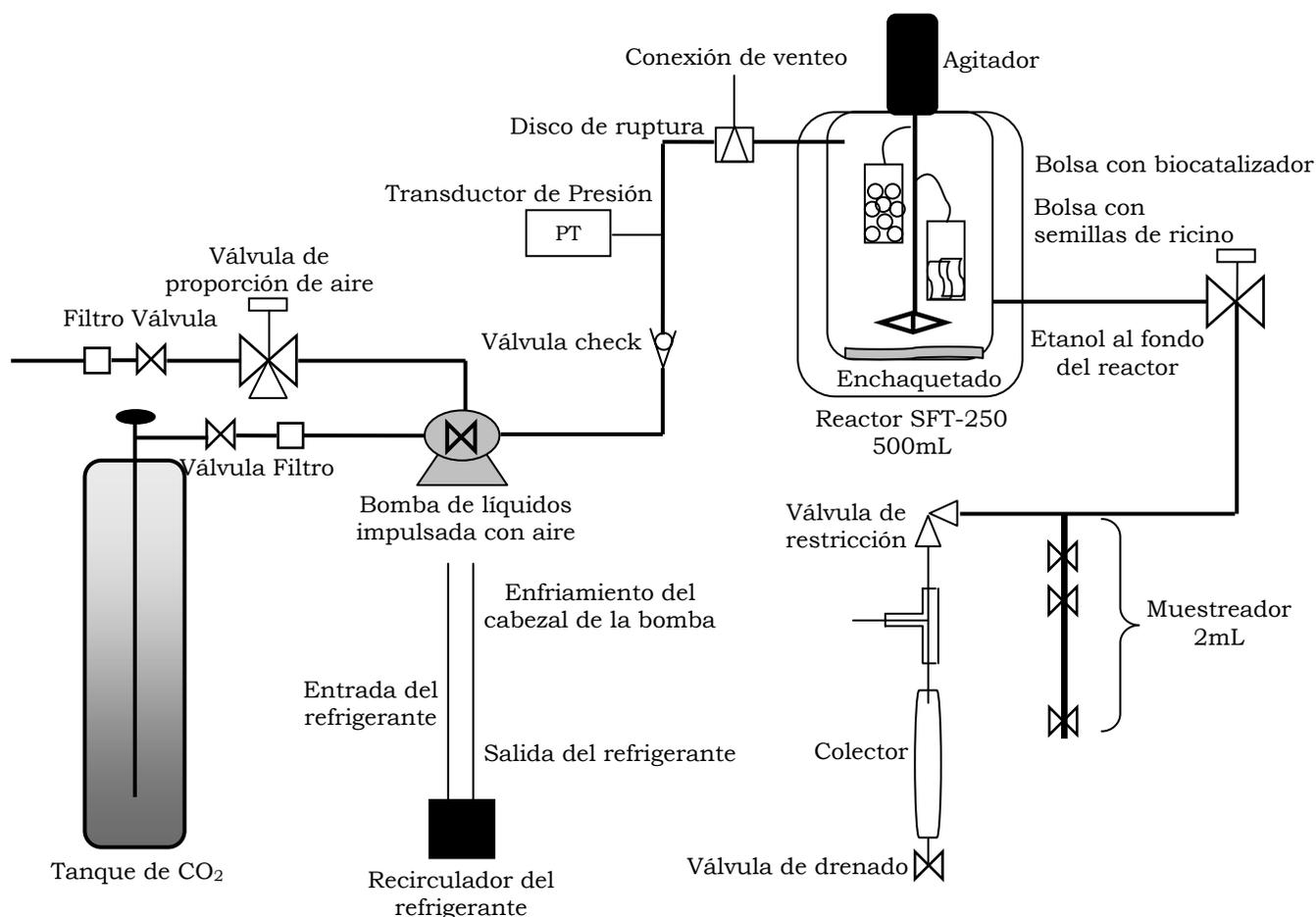


Figura 13. Diagrama de flujo general del CO₂ en el sistema SFT-250 (Adaptado del manual de operación)

5.6. Procesos de derivatización de lípidos para la cuantificación de ácido ricinoleico total.

5.6.1. Transesterificación Ácida para la determinación de ácido ricinoleico total extraído. Se tomaron alícuotas de 0.5mL de cada muestra de mezcla de reacción y se sometieron a una transesterificación con una disolución etanólica de H₂SO₄ al 2% a 80°C durante 1h, para producir los correspondientes ésteres etílicos de los ácidos grasos (EEAG). Los EEAG se extrajeron con 2mL de hexano, 1mL de disolución KCl 0.1M y centrifugando a 1000 rpm durante 15min. La fase superior de hexano se separó en viales y se concentró bajo atmósfera de nitrógeno (*Seriburi & Akoh, 1998*). El residuo se resuspendió en 100µL de hexano y se inyectó 1µl en el cromatógrafo de gases (HP 5890 serie II), equipado con una columna de Carbowax 20 M (HP-20M) de 25m de longitud, 0.32mm de diámetro interno y 0.3µm de grosor de película; con detector de ionización de flama (FID) y operado en un modo split. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 210°C y 220°C, respectivamente. La temperatura programada (rampa) para el cromatógrafo fue de 1min a 80°C, la temperatura se elevó a una velocidad de 20°C min⁻¹ hasta 150°C y después de un período isotérmico de 2min, la temperatura se aumentó a una velocidad de 5°C min⁻¹ hasta 220°C mantenida por 10min. Las determinaciones cromatográficas se hicieron por duplicado.

Los valores de tiempos de retención de los EEAG pertenecientes a las muestras de triglicéridos, se obtuvieron de la inyección de una mezcla cuantitativa de estándares de ésteres metílicos (Estándar AOCS #6, marca Restek), cuyos componentes son los apropiados para el análisis de grasas de origen animal y aceite de palma. El tiempo de retención y la concentración componente principal de la mezcla de reacción, el éster etílico de ácido ricinoleico (EEAR), se determinó mediante la inyección del estándar (Sigma) a diferentes concentraciones para construir la curva estándar correspondiente.

5.6.2. Silanización con Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) para la determinación de ácido ricinoleico transesterificado enzimáticamente. En un vial perfectamente limpio y seco se colocaron 100µL de mezcla de reacción obtenida del reactor y se concentró bajo atmósfera de nitrógeno hasta la eliminación total del etanol. Posteriormente, el concentrado se resuspendió en piridina y se adicionaron

200 μ L del agente silanizante (BSTFA). Se desplazó el aire con un flujo suave de nitrógeno, se selló el vial y se llevó a cabo la silanización a 90°C durante 30min.

De la muestra silanizada se tomó 1 μ l y se inyectó en un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, equipado con una columna de DB-5HT compuesta de 5%-fenilmetilpolisiloxanos (J&W Scientific) de dimensiones 30mX0.32mmX0.1 μ m; un detector de ionización de flama (FID) y operado en un modo split. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 350°C y 380°C, respectivamente. El programa de temperatura empleado fue de 1min a 200°C, la temperatura se elevó a una velocidad de 80°C min⁻¹ hasta 260°C, inmediatamente después la temperatura se aumentó a una velocidad de 0.5°C min⁻¹ hasta 265°C y finalmente la temperatura se incrementó a una velocidad de 10°C min⁻¹ hasta 380°C mantenida por 10min. Las determinaciones cromatográficas se hicieron por duplicado.

Los tiempos de retención y concentración del éster etílico de ácido ricinoleico (Sigma), se determinaron por medio de una curva estándar del compuesto silanizado, por el mismo procedimiento de silanización. Con la finalidad de determinar tiempos de retención de los diferentes componentes de una mezcla de reacción y estandarizar la rampa de temperatura del cromatógrafo de gases, se inyectaron estándares de ácido ricinoleico (AR), de éster etílico de ácido ricinoleico (EEAR) y una mezcla estándar de lípidos compuesta de Monooleína, Dioleína y Trioleína (Sigma).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. Caracterización de las semillas de ricino

Las semillas de ricino se sometieron a técnicas de análisis proximal mediante las cuales se determinó su composición química general. Los valores reportados y los datos experimentales promedio obtenidos se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Resultados del análisis químico proximal de semillas de ricino.

Determinación	Valor teórico ^a (% Peso)	Valor experimental (% Peso)
Humedad y materia volátil	3-7%	5.72
Cenizas totales	6%	7.1%
Proteína	17-25%	18.15%
Extracto etéreo	45-52%	44.99%

^aFuente: Rossel & Pritchard, 1991.

El valor de humedad promedio obtenido cae dentro del intervalo de humedad de referencia.

Los constituyentes lipídicos de las semillas de ricino, básicamente grasas neutras (triglicéridos) y ácidos grasos libres, se determinaron por extracción con éter etílico. La cantidad de lípido extraída de las semillas de ricino utilizadas para este trabajo fue del 45% peso, que se encontró dentro del intervalo de referencia.

Para las determinaciones de cenizas totales y contenido total de proteína, se partió de muestras derivadas de la torta residual de la extracción de lípidos con disolvente. Para ambas pruebas, los valores promedio obtenidos se encontraron dentro de los intervalos esperados.

6.2. Caracterización de aceite de ricino extraído de semillas de ricino.

El aceite de ricino se extrajo utilizando dos métodos. El método de Soxhlet, que consiste en un proceso semicontinuo exhaustivo empleando como disolvente éter de petróleo. El segundo procedimiento se realizó empleando dióxido de carbono supercrítico (ScCO₂) como medio de extracción, a condiciones de 80°C y 305bar de presión.

La composición de ácidos grasos presentes en el aceite de ricino extraído por ambos métodos, se analizaron y compararon con base en sus derivados esterificados analizados por cromatografía de gases (Figura 14). Esta derivatización consistió en una transesterificación ácida con etanol, de los ácidos grasos libres y esterificados al

esqueleto de glicerol (triglicéridos), produciendo así los ésteres etílicos de ácidos grasos (EEAG) (*Current Protocols*, 2001).

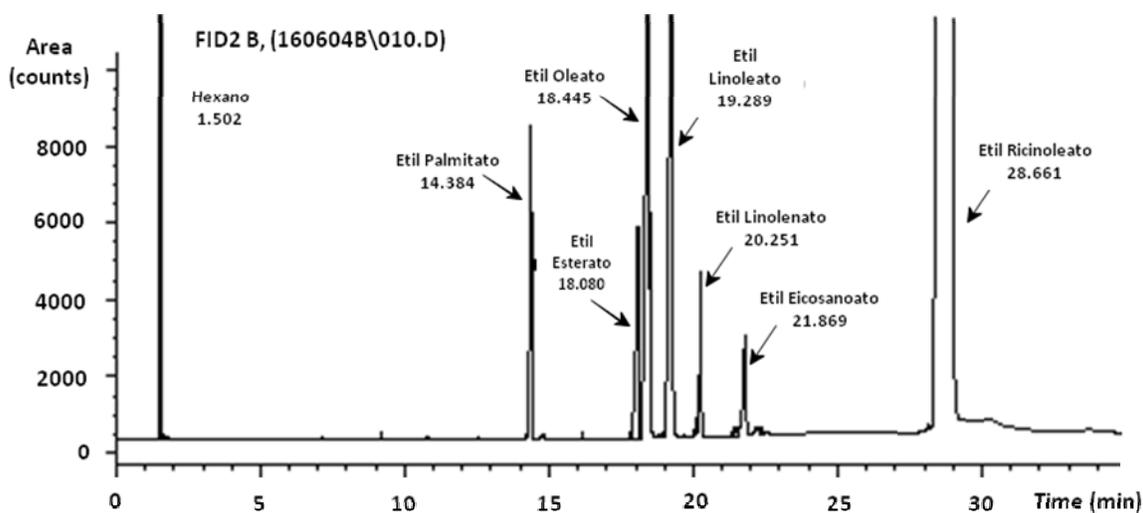


Figura 14. Cromatograma representativo de los derivados de ácidos grasos presentes en el aceite de ricino, determinado mediante cromatografía de gases. Condiciones: Columna capilar Carbowax 20M, rampa de 1min a 80°C 150°C a una velocidad de 20°C min⁻¹ con un período isotérmico de 2min y un aumento de temperatura a una velocidad de 5°C min⁻¹ hasta 220°C mantenida por 10min; inyector a 210°C y detector a 220°C.

Para los dos métodos de extracción se encontró una solubilidad máxima de aceite de ricino del 45% en peso. Como se muestra en la Figura 15, en ambos casos la proporción de los componentes de lípidos neutros extraídos fue similar, pues no se encontraron diferencias significativas entre sus perfiles de ácidos grasos. El ácido graso que está presente en mayor proporción es el ácido ricinoleico (~85% en peso).

Los aceites de ricino extraídos por ambos métodos fueron sometidos a un análisis de calidad mediante la determinación de algunas de sus propiedades químicas. Las especificaciones estándar de calidad del aceite de ricino se muestran en la Tabla V, junto con datos encontrados para ambos aceites.

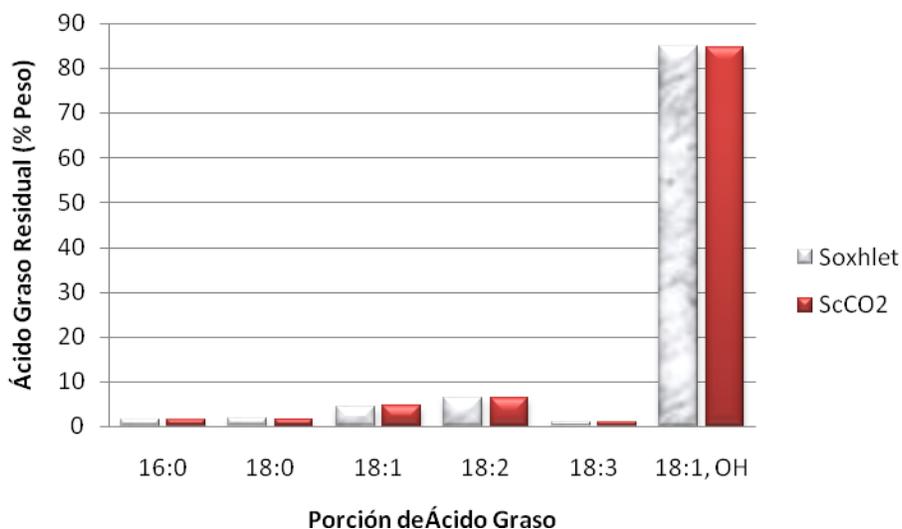


Figura 15. Perfil de ácidos grasos del aceite de ricino extraído por dos métodos a partir de semillas de ricino (Nomenclatura de los ácidos grasos 16:0 Palmítico; 18:0 Esteárico; 18:1 Oleico; 18:2 Linoleico; 18:3 Linolénico; 18:1,OH Ricinoleico)

El índice de saponificación indica una medida de los ácidos grasos totales que existe en el aceite de ricino y es directamente proporcional a su masa molecular. El índice de yodo determina el grado de insaturación que presentan los ácidos grasos que conforman los triglicéridos de la muestra. El índice de acidez demuestra la presencia de ácidos grasos libres en el aceite, resultado de la acción hidrolítica o descomposición lipolítica de los triglicéridos por enzimas, tratamientos químicos o acción bacteriana.

Tabla V. Propiedades químicas del aceite de ricino

Propiedad	Intervalo ^a	Extraído por Soxhlet	Extraído por ScCO ₂
Valor saponificable (mg KOH/g muestra)	176-184	181	180
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)	84-88	87	86
Índice de acidez (mg KOH/g muestra)	0.4-4.0	2.5	1.95

^aFuente: Kirk-Othmer, 1993; ASTM

En general, los aceites extraídos presentaron valores similares que se encuentran dentro de los intervalos correspondientes a cada prueba del análisis químico.

6.3. Extracción de aceite de ricino en ScCO₂.

Empleando como referencia una curva estándar de éster etílico de ácido ricinoleico (Anexo I.A), se determinó la cantidad de aceite extraído con respecto a éste, debido a que el ácido ricinoleico es el componente principal del aceite. La extracción en ScCO₂ se llevó a cabo a las condiciones óptimas del sistema extracción/reacción que se tomaron de referencia (*Turner et al., 2004*), 305bar y 80°C.

Bajo estas condiciones se obtuvo una extracción del 63.44% en peso de ácido ricinoleico (0.25g AR/g semillas), del total presente en las semillas de ricino (~0.38g AR/g semillas). Lo anterior, refiriéndonos a una muestra de semilla de ricino de la cual se puede obtener un 45% en peso de aceite de ricino. Dentro de esta fracción lipídica, el 85% en peso es ácido ricinoleico.

Se modificaron las condiciones de extracción, utilizando el ScCO₂ a una presión de 350bar y tres diferentes temperaturas 50, 60 y 70°C. Se ha demostrado que el intervalo de extracción de lípidos con ScCO₂ puede extenderse incrementando la presión del sistema hasta aproximadamente 900bar (*Cuperus et al., 1996*). Dado que son presiones muy altas y difíciles de manejar, es más práctico trabajar con presiones entre 300-4000bar para lograr una buena solubilidad de los triglicéridos en el fluido (*Nilsson & Hudson, 1993; Devittori et al., 2000*). Además, por tratarse de un fluido “sintonizable”, una simple variación de temperatura ayuda a modificar la densidad (ρ) del ScCO₂, parámetro físico que influye directamente en la solubilidad de los lípidos (*Bozan & Temelli, 2002*).

Se evaluó la extracción a diferentes tiempos para las condiciones mencionadas, obteniéndose un rendimiento máximo a las 2.5 horas de iniciado el proceso. En la Figura 16 están representados los valores experimentales de extracción de ácido ricinoleico, comparados con los valores teóricos de extracción total de ácido ricinoleico, calculados a partir del peso total de cada muestra de semillas.

Se encontró que empleando CO₂ supercrítico con una $\rho=0.75\text{g/mL}$ (80°C, 305bar) y $\rho=0.95\text{g/mL}$ (50°C, 350bar) se obtienen los rendimientos más bajos de extracción, mientras que para las densidades de 0.85 (60°C, 350bar) y 0.80g/mL (70°C, 350bar), hubo una mejor extracción del total de ácido ricinoleico que puede encontrarse en la fracción lipídica de las semillas de ricino.

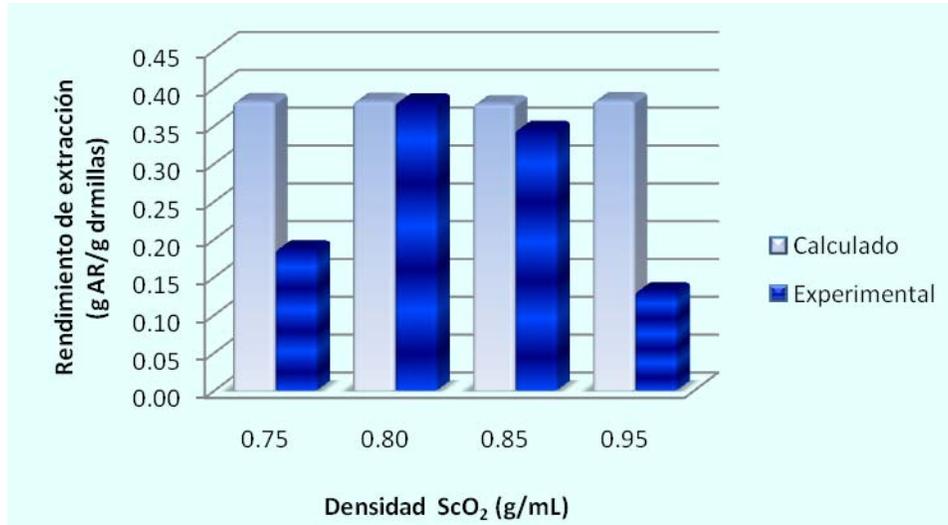


Figura 16. Extracción de aceite de ricino obtenido a partir de las semillas, con respecto a la densidad de ScCO₂ (Tiempo 2.5 horas)

De acuerdo a los datos publicados por *Taylor (1996)* (Figura 17) sobre la relación densidad-temperatura-presión del dióxido de carbono y los resultados reportados por *Devittori (2000)*, se esperaba que para una presión de 350bar se obtuviera una disminución de la extracción conforme se aumentaba la temperatura. Entre 300-350bar de presión, la extracción de lípidos se favorece a temperaturas bajas, debido al incremento en la densidad del fluido supercrítico. Contrario a datos reportados, se obtuvo una extracción menor de aceite de ricino a la temperatura más baja utilizada (50°C).

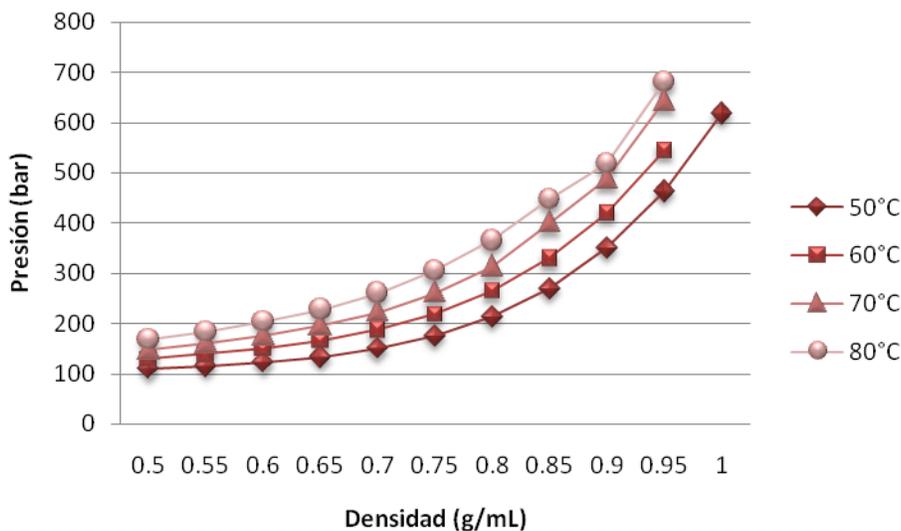


Figura 17. Relación Densidad-Temperatura-Presión del CO₂ (*Taylor, 1996*)

Esto posiblemente se debió a que el parámetro de solubilidad del aceite de ricino en ScCO₂ está en función del efecto cruzado presión-temperatura. El aumento de temperatura influyó directamente sobre la presión de vapor de los triglicéridos del aceite de ricino junto con su solubilidad en el fluido supercrítico.

6.4. Determinación de la cinética de extracción de aceite de ricino en ScCO₂

Para poder analizar el efecto de la temperatura en la extracción de aceite de ricino en ScCO₂, se efectuaron los experimentos con cuatro temperaturas diferentes (50, 60, 70 y 80°C) y una presión de 350bar.

En la Figura 18, se muestran los perfiles de extracción donde se alcanzan a distinguir dos fases durante la extracción en ScCO₂ (Cuperus et al., 1996). Inicialmente, la velocidad aparente de extracción de aceite fue muy rápida hasta las 0.5 horas de iniciado el proceso, posiblemente porque las semillas se despojaron de su capa externa de lípidos (fase de lavado). Probablemente, durante la siguiente etapa a la que llaman “período de difusión”, el transporte de aceite disminuyó por la reducción gradual de la capa de lípidos en la matriz de las semillas.

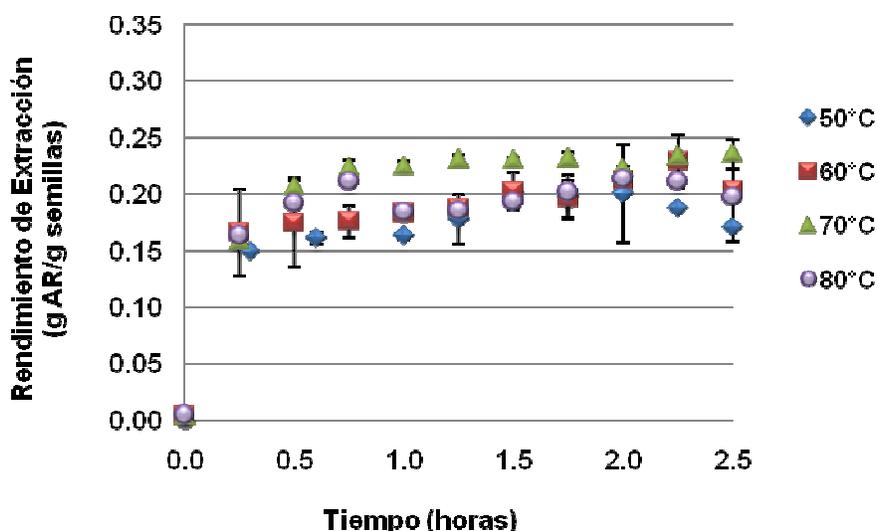


Figura 18. Efecto de la temperatura en la cinética de extracción de ácido ricinoleico a partir de las semillas de ricino con A_w inicial de 0.6 en ScCO₂ (350bar de presión y 130rpm).

El análisis comparativo de las curvas de la Figura 18 distingue un rendimiento de extracción de ácido ricinoleico más alto cuando las muestras se trataron a 70 y 80°C, pues prácticamente desde las 0.75 horas de extracción se había extraído el total del aceite. Mientras que para las muestras tratadas a temperaturas de 50 y 60°C, la extracción fue más lenta. No se alcanza a distinguir el máximo de extracción (~0.38g AR/g semilla), debido a que las condiciones de proceso no permitieron una extracción total del aceite de ricino de las semillas (los rendimientos totales fueron de 0.24g AR/g asemilla a 50°C, 0.27g AR/g asemilla a 60°C, 0.29g AR/g asemilla a 70°C y 0.25g AR/g asemilla a 80°C).

En general la extracción de ácido ricinoleico se vio favorecida al incrementar la temperatura. Esto se debió a que, la disminución de la densidad de fluido supercrítico causada por el aumento de temperatura fue compensada por un aumento en la presión de vapor de los lípidos (Turner et al., 2004).

Se obtuvieron las tasas aproximadas de extracción del ácido ricinoleico (Figura 19) para cada temperatura, a partir de las pendientes de la parte lineal al inicio de la extracción. Comparando la rapidez inicial de extracción del ácido ricinoleico para cada temperatura, se puede ver claramente que la mayor rapidez ocurre a 70°C. Por ello, se decidió utilizar dichas condiciones de temperatura y presión en las pruebas simultáneas de extracción de aceite de ricino y reacción con etanol en fluido supercrítico.

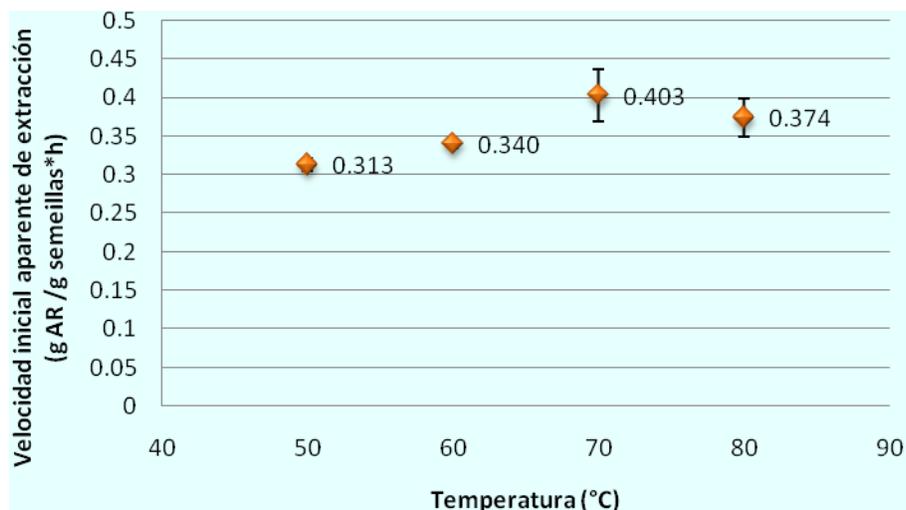


Figura 19. Velocidades iniciales aparentes de extracción de ácido ricinoleico en ScCO₂ a 350bar y 130rpm, en función de la temperatura.

6.5. Efecto de la actividad de agua en la extracción de aceite de ricino en ScCO₂.

Desde mediados de los años 80's, se ha estudiado la extracción, separación y fraccionamiento de aceites y grasas en dióxido de carbono supercrítico, a partir de diferentes matrices o cultivos. La solubilidad de los ácidos grasos y sus derivados esterificados, disminuye en ScCO₂ con el incremento en su número de carbonos y su peso molecular (Akoh, 2002). Pero la influencia de la gran variedad de parámetros experimentales, tales como: la presión y temperatura -que determinan las propiedades de difusividad y viscosidad del CO₂ en estado supercrítico-, el secado o molido de la materia prima, el tiempo del proceso, etcétera, determinan el rendimiento de extracción del aceite y su calidad.

Debido a que la humedad en las semillas de ricino es una de las principales características que influye en la extracción del aceite con ScCO₂, se realizó un estudio del efecto del agua a condiciones constantes de 70°C, 350bar y 130rpm. Sin embargo, para hacer un análisis del efecto del agua en reacciones en medios no acuosos, es preferible expresarla en términos de actividad termodinámica, en lugar de contenido de agua o concentración de agua.

Para ello, se utilizaron cuatro diferentes actividades acuosas iniciales (A_w): $A_w=0.040$, $A_w=0.321$, $A_w=0.610$ y $A_w=0.948$. La primera actividad de agua es aproximada y corresponde al producto resultante de liofilizar las muestras. Las siguientes se obtuvieron mediante el acondicionamiento de las semillas por exposición al vapor acuoso de disoluciones salinas saturadas durante 48 horas (Halling, 1994; Greenspan, 1977).

En la Figura 20 se muestra el efecto de la actividad de agua inicial en la extracción de ácido ricinoleico en ScCO₂, donde se obtuvieron los siguientes rendimientos totales de extracción: 0.20g AR/g semilla con $A_w=0.04$, 0.20g AR/g semilla con $A_w=0.321$, 0.23g AR/g semilla con $A_w=0.610$, y 0.30g AR/g semilla $A_w=0.948$. Igualmente, se obtuvieron las velocidades iniciales de extracción de ácido ricinoleico (Figura 21), para cada una de las actividades acuosas iniciales estudiadas.

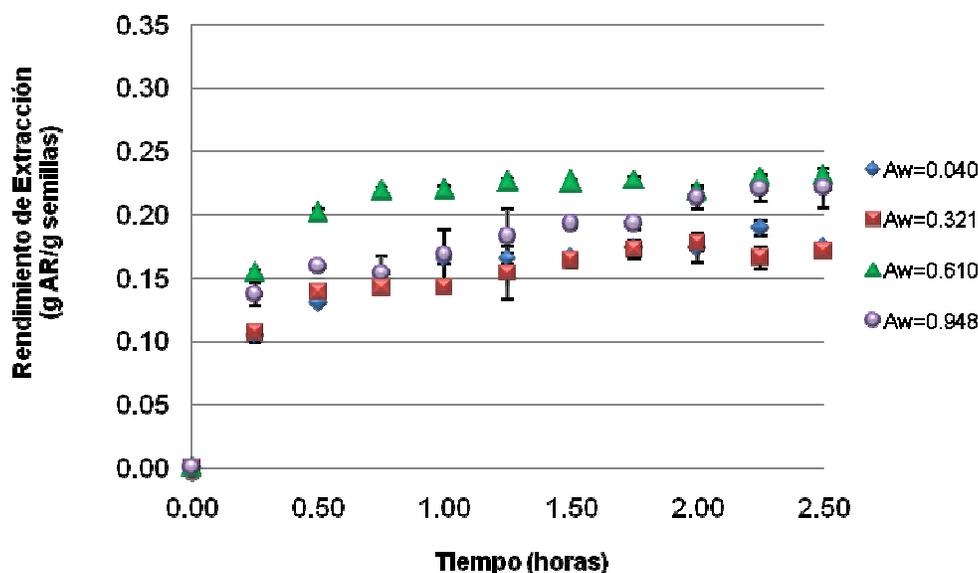


Figura 20. Efecto de la actividad de agua inicial (A_w) en la extracción de ácido ricinoleico en $ScCO_2$ a $70^\circ C$, 350bar y 130rpm.

La actividad acuosa inicial y la naturaleza de los triglicéridos del aceite de ricino a extraer son dos factores importantes, que actúan directamente sobre este proceso de extracción. En ninguno de los casos se logró un máximo de extracción, quizá por el carácter relativamente polar que exhibe el aceite a causa de la alta concentración de ácido ricinoleico presente en sus triglicéridos. Este ácido graso se distingue de la mayoría por poseer un grupo hidroxilo en su cadena alifática, que le imparte un atributo polar del que se puede valer para interactuar con moléculas vecinas mediante puentes de hidrógeno (Cuperus et al., 1996).

Por definición, la actividad de agua es una medida de la disponibilidad de agua para interactuar en un sistema (Kirk et al., 2005). Para este sistema en particular, las semillas acondicionadas con una actividad de agua inicial de 0.610, favorecieron la rápida extracción del aceite de ricino (Figura 21). Cuando el A_w inicial fue de 0.610, la cantidad de agua asociada a las semillas permitió la interacción con los grupos polares permitiendo una mayor solubilidad en el fluido supercrítico. Algunos investigadores dedicados al estudio de las propiedades del CO_2 (Fujii et al., 2002; Blatchford et al., 2003), han demostrado que esta molécula puede llegar a formar enlaces de hidrógeno, entre un átomo de oxígeno del CO_2 y grupos hidroxilo (-OH) o carbonilo (-COOH).

Posiblemente esta interacción C-H...O, intermolecular entre el oxígeno del CO₂ y el átomo de hidrógeno del ácido ricinoleico, pudo favorecer la rápida solvatación del aceite de ricino en el fluido supercrítico.

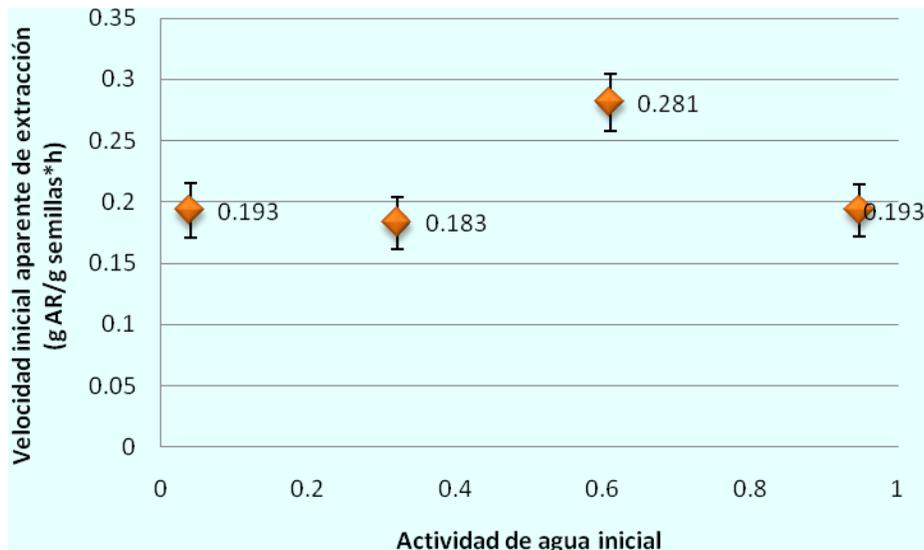


Figura 21. Velocidades iniciales aparentes de extracción de ácido ricinoleico en ScCO₂ a 70°C, 350bar, 130rpm, a diferentes valores de actividad de agua inicial.

Para las extracciones de aceite de semillas con valores menores de actividad acuosa inicial 0.6, el agua presente solamente contribuyó a la hidratación de la matriz vegetal. Durante el proceso de densificación del CO₂ hasta alcanzadas las condiciones de trabajo, las semillas molidas pudieron ser reestructuradas, fracturadas y/o deformadas (*del Valle et al., 2005*). Estos eventos posiblemente contribuyeron a que el soluto quedase atrapado dentro de la matriz sólida, por una probable compactación o colapso de la matriz, que ocasionó la disminución de la difusividad del ácido ricinoleico al fluido supercrítico durante el inicio de la extracción.

En cuanto a los procesos de extracción con un valor de actividad de agua inicial mayor a 0.6, las moléculas de agua adsorbidas a la matriz sólida de las semillas pudieron llegar a condensarse y formar capas secundarias de hidratación, entorpeciendo así la transferencia de masa de los lípidos al seno de fluido (*Beckett, 1995*).

Sin embargo, los valores diferentes de actividad de agua inicial no afectaron los rendimientos de extracción al final de las 3 horas de proceso (promedio final de extracción de ácido ricinoleico, 94.08%), lo que indicó que el A_w inicial no tiene un efecto determinante sobre el proceso de extracción.

Después de estandarizar la metodología de extracción del aceite de ricino en CO_2 supercrítico, se procedió a ajustar las condiciones seleccionadas al sistema incorporado de extracción/reacción de transesterificación en fluido supercrítico.

6.6. Influencia de la actividad de agua en el sistema extracción/reacción en ScCO_2 .

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la influencia de la actividad de agua (A_w) en la reacción enzimática de transesterificación de triglicéridos de aceite de ricino y etanol, empleando dióxido de carbono supercrítico como medio de extracción y reacción a 70°C, 350bar y 130rpm.

La disponibilidad de agua en un medio de reacción no acuoso es un parámetro clave para determinar el equilibrio y rendimiento de una reacción. Por ello, se acondicionaron previamente los componentes involucrados en la reacción a una A_w inicial fija, con disoluciones salinas saturadas, según se describió previamente.

Una vez que el reactor se cargó con el catalizador y los sustratos, y se alcanzaron las condiciones de operación, se extrajeron muestras para monitorear los cambios de la composición a intervalos de 15min. De las muestras obtenidas, se tomaron dos alícuotas de 0.5mL y cada una de ellas se sometió a un proceso de derivatización diferente (según la metodología descrita en la página 26).

Ambas técnicas tienen la finalidad de producir derivados de lípidos con menores puntos de ebullición, lo que los hace más volátiles y, por tanto, más apropiados para su análisis por cromatografía de gases (Eder, 1995).

Como ya se había mencionado, la primera de ellas consistió en la transesterificación ácida de la mezcla de reacción con etanol, que originó los correspondientes ésteres etílicos de todos los ácidos grasos presentes en la mezcla de reacción. Con esta técnica se determinó el avance de extracción para cada intervalo de tiempo, con respecto a la cantidad del derivado principal del aceite, el éster etílico del ácido ricinoleico (EEAR), utilizando cromatografía de gases.

La Figura 22 muestra el progreso de la extracción de ácido ricinoleico a una actividad de agua inicial de 0.015 (liofilización) y 0.748. La extracción de lípidos alcanzó un máximo a las 0.75 horas. Esto debido a la presencia de etanol en el sistema, que actuó como cosolvente ayudando a solubilizar el aceite en el fluido. Esta mejora en la solubilidad pudo deberse al incremento en la densidad y la polaridad del ScCO₂, y a las interacciones intermoleculares (puentes de hidrógeno) entre los ácidos grasos y el etanol (Dumont *et al.*, 1992, Yamamoto *et al.*, 1999). Este efecto del etanol, actuando como cosolvente no sólo influyó en la solubilidad de la fracción lipídica, eventualmente también sobre las propiedades de transferencia de masa y, posiblemente, sobre la velocidad de reacción.

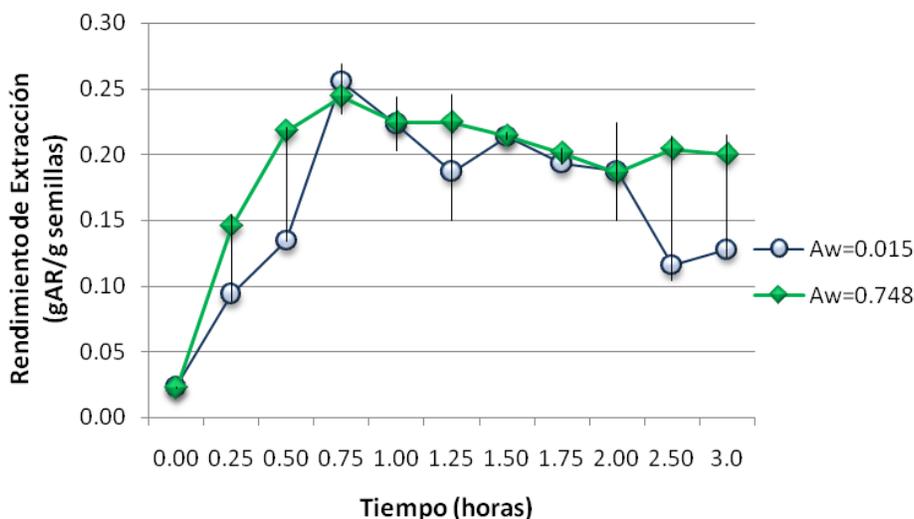


Figura 22. Cinética de extracción de ácido ricinoleico con A_w inicial de 0.015 y 0.748, en el sistema extracción/reacción en ScCO₂ a 70°C, 350bar y 130rpm.

Al evaluar el comportamiento de los sistemas con dos diferentes actividades de agua (Figura 22), se observó que había una variabilidad en los datos recopilados, probablemente debida a la continua adquisición de muestras (cada 15 minutos), que alteraba la concentración de los sustratos dentro del reactor. No solo la concentración de sustratos disminuyó conforme progresaba la reacción, sino también con la salida de muestras que contenía la mezcla de reacción.

Debido a las fluctuaciones anteriores, se decidió tomar únicamente dos muestras durante el proceso a los tiempos de 0.083 y 3 horas. La primera muestra para poder analizar la rapidez inicial del proceso y la segunda para asegurar el máximo de rendimiento de extracción/reacción en el sistema.

La Figura 23 muestra los máximos de extracción para todos los sistemas tratados con diferente actividad de agua inicial, encontrándose un rendimiento promedio el 96.66% de extracción total de ácido ricinoleico. El empleo de etanol en el sistema no sólo sirvió como sustrato de reacción, sino también como modificador de las propiedades del fluido supercrítico.

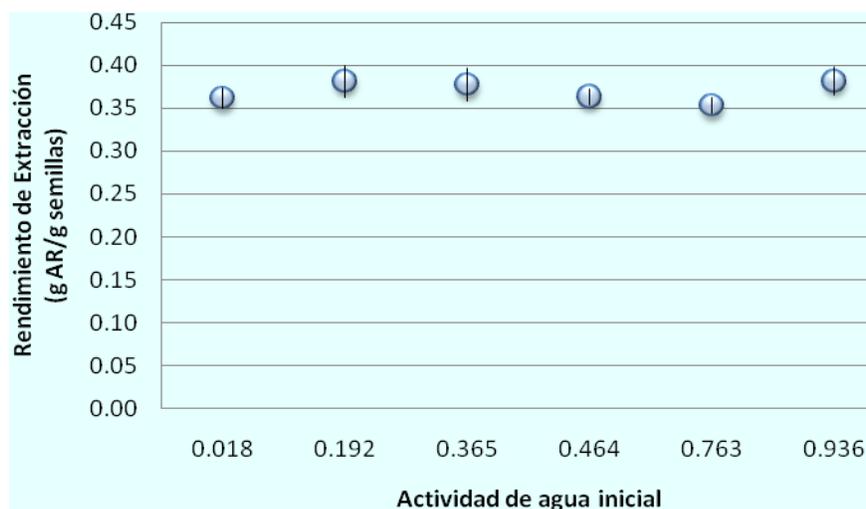


Figura 23. Rendimiento de extracción de ácido ricinoleico con respecto al A_w inicial del catalizador y sustratos, en el sistema extracción/reacción en $ScCO_2$, durante 3 horas a $70^\circ C$, 350bar y 130rpm.

Dado que existe una gran afinidad química entre el alcohol etílico y el aceite de ricino, y dado que, un proceso de solvatación depende de la interacción química entre el soluto y el disolvente, la adición del etanol como cosolvente incrementó el número de interacciones químicas involucradas con los triglicéridos del aceite, lo que implicó un número mayor de moléculas de soluto disueltas.

La solubilidad del aceite de ricino en CO_2 supercrítico, puede ser incrementada si la presión de trabajo aumenta de 344 a 690bar (Cuperus et al., 1996). Sin embargo, trabajar a presiones tan elevadas no es práctico, principalmente por los altos costos de inversión. El incremento en la solubilidad asociado a las interacciones intermoleculares entre el etanol y triglicéridos del aceite de ricino, puede ser importante para el diseño de procesos. Esto significa que un proceso puede ser llevado a cabo con condiciones de trabajo menos drásticas, y seguir obteniendo una solubilidad eficaz y mejor velocidad inicial de extracción similar (Figura 24). Contar con condiciones que favorecen la extracción es importante ya que puede afectar

positivamente a la reacción. Cabe destacar que no se percibió ningún efecto de la actividad de agua inicial de los sustratos en la velocidad o el rendimiento de extracción de ácido ricinoleico.

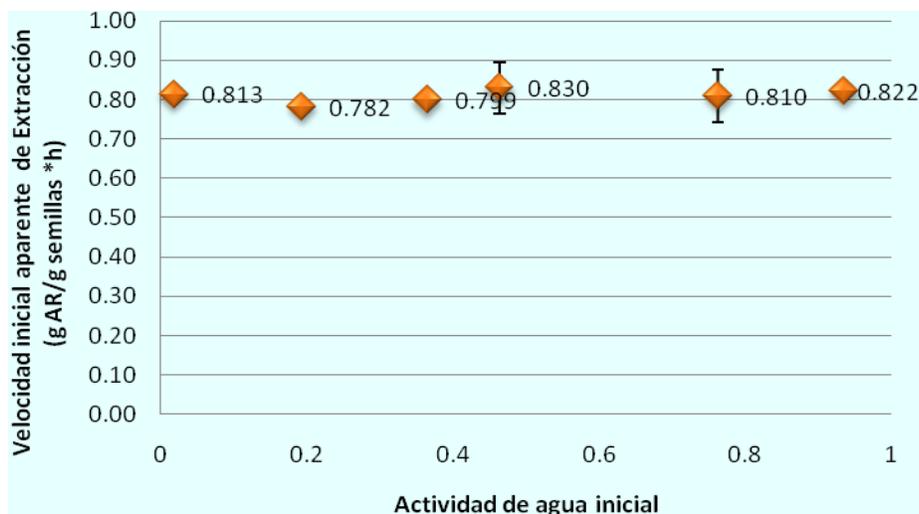


Figura 24. Velocidad inicial aparente de extracción en función de la actividad de agua inicial de sustratos y biocatalizador, en el sistema extracción/reacción en ScCO₂ a 70°C, 350 bar y 130 rpm.

En lo que concierne al estudio de la reacción enzimática de alcoholisis, Los ácidos grasos son comúnmente analizados mediante cromatografía de gases por medio de la formación de sus derivados ésteres metílicos, que son más volátiles por tener un punto de ebullición menor (*Eder, 1995*). Dado que el éster etílico del ácido ricinoleico es el principal producto de la reacción enzimática, se requirió de una derivatización diferente para distinguirlo de los compuestos intermediarios en la mezcla de reacción. Mediante la técnica de silanización se lograron separar los componentes de la reacción, dentro de los cuales se encontraba el ácido ricinoleico libre, o esterificado en forma de mono-, di- o triglicéridos.

Este tipo de derivatización se basa en el empleo de un agente silanizante (en este caso BSTFA) que reacciona con los compuestos que contienen grupos funcionales con hidrógeno activo (OH, NH, SH). El carácter de la molécula a analizar pasa de polar y activa, a no polar e inerte, acompañándose con un incremento de volatilidad y estabilidad, originando los derivados de trimetil-silil ésteres (*Blaw & Halket, 1993*).

El esquema general de formación de derivados de trimetilsilil (TMS) de una muestra proveniente de la mezcla de reacción, se expone en la Figura 25. Dicha

representación propone la conversión total de triricinoleína (triglicérido que prevalece en el aceite de ricino), en éster etílico de ácido ricinoleico (EEAG) vía alcoholísis enzimática. No obstante, en una mezcla de reacción existen productos intermedios de la reacción e incluso sustrato sin reaccionar.

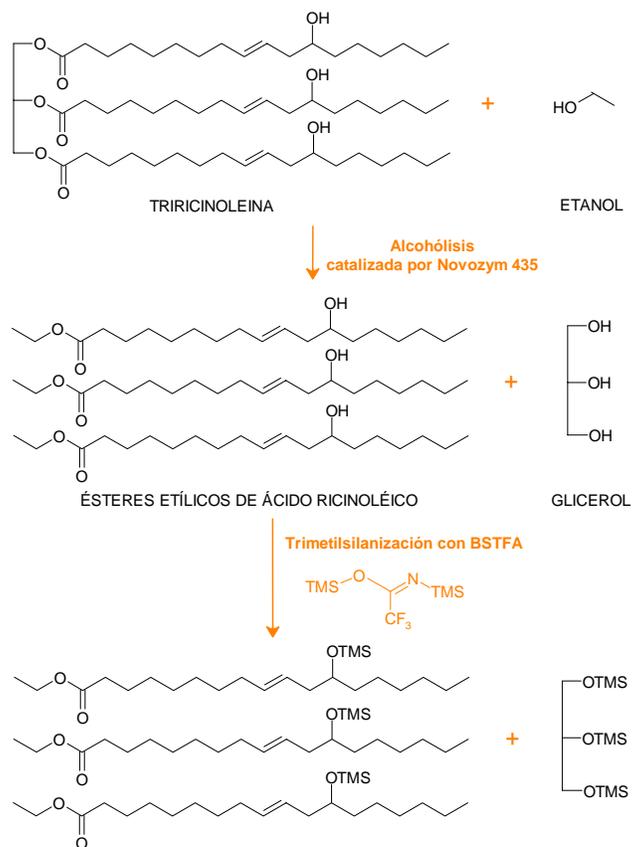


Figura 25. Esquema general del tratamiento de silanización de una muestra proveniente de la mezcla, para la identificación del éster etílico de ácido ricinoleico producido vía enzimática.

Mediante el proceso de silanización, los grupos hidroxilo y ácidos carboxílicos de los compuestos intermedios, fueron convertidos a los derivados de TMS y detectados por cromatografía de gases de alta temperatura. En la Figura 25 se presenta el perfil característico obtenido de la inyección de una muestra de reacción. En este cromatograma se indican los intervalos de tiempo de elución de las diferentes clases de lípidos encontradas en la muestra, entre los cuales se incluyen los ésteres etílicos de los ácidos grasos (EEAG), éster TMS de ácido ricinoleico (ARS), monoacilglicéridos (como éteres di-TMS), diacilglicéridos (como éteres TMS) y triglicéridos (con un grupo TMS en cada C12, para el caso de ácido ricinoleico unido al esqueleto de glicerol).

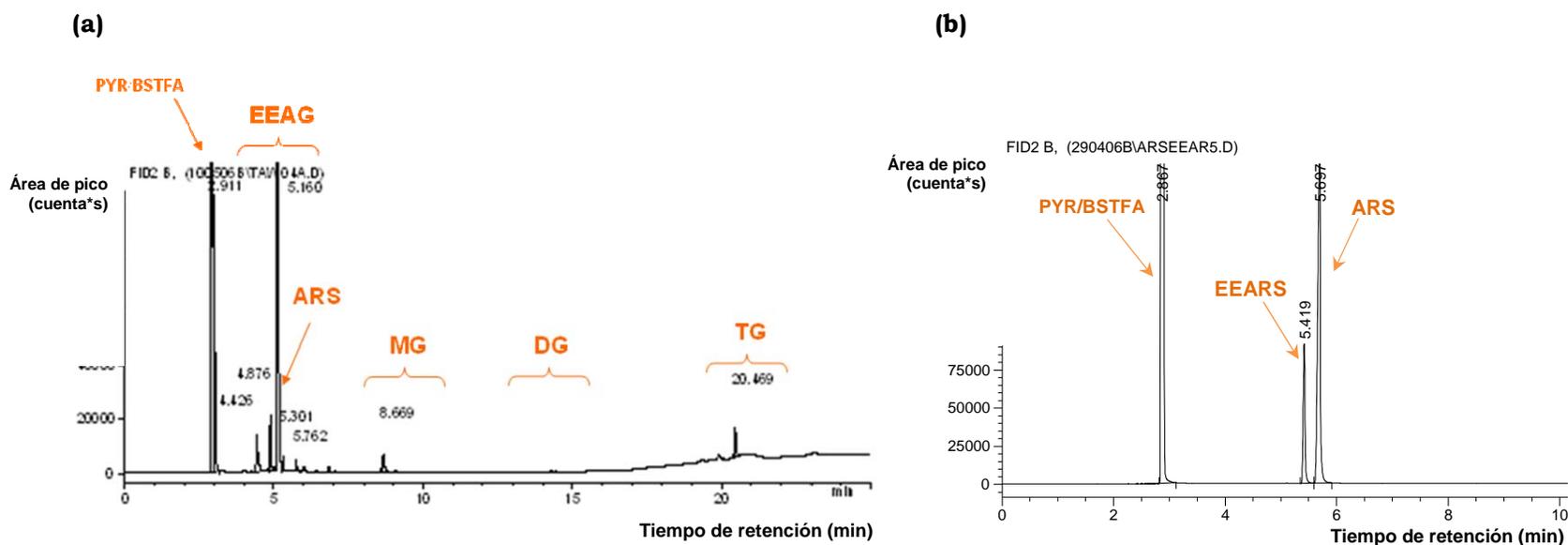


Figura 26. (a) Cromatograma representativo de los derivados silanizados de los componentes presentes en la mezcla de reacción, determinado mediante cromatografía de gases. **(b)** Cromatograma donde se muestra la separación de los productos cuantificados de las muestras. Condiciones: Columna capilar DB-5HT compuesta de 5% fenil-metilpolisiloxanos (30mX0.32mm i.d. y 0.1µm grosor de película) con una rampa utilizada 1 min a 200°C hasta 260°C a 80°C min⁻¹, seguida de un aumento a 0.5°C min⁻¹ hasta 265°C y finalmente hasta 380°C a una velocidad de 10°C min⁻¹; la temperatura del inyector a 350°C y del detector de ionización de flama (FID) 380°C. Nomenclatura: PYR/BSTFA, mezcla de piridina (disolvente) y agente silanizante; EEAG, ésteres etílicos de los ácidos grasos; ARS, éster TMS de ácido ricinoleico; MG, éteres di-TMS de monoglicéridos; DG, éteres TMS de diglicéridos; TG, triglicéridos; EEARS, éster etílico-12-TMS de ácido ricinoleico.

Debido a que el ácido ricinoleico es el componente que predomina en el aceite de ricino, el rendimiento de reacción se determinó conforme a la curva estándar del derivado de TMS del producto de la reacción enzimática, o sea, el éster etílico (12-TMS) de ácido ricinoleico (Anexo I.B). El rendimiento de reacción se refirió simplemente como la cantidad de ácido ricinoleico convertido (EEAR) por gramo de muestra.

La reacción de alcoholólisis consta de una transferencia del grupo acilo. En la Figura 27 se representa un esquema general del mecanismo de transesterificación enzimática, con las interacciones entre formas enzimáticas, sustratos y productos.

En la primera etapa de la reacción (Figura 27.I), los triglicéridos del aceite de ricino reaccionan con la lipasa produciendo un complejo enzima-triacilglicérido, el cual es hidrolizado y se libera el primer producto intermediario de la reacción, un diacilglicérido. Después, se forma un complejo intermediario acil-enzima ($E'-AG$). Al ingresar el segundo sustrato (etanol), reacciona en forma nucleofílica, provocando la desacilación de la enzima, para recuperar la enzima libre (E) y una molécula del producto final ($EEAG$). Para que la alcoholólisis del aceite de ricino se lleve a cabo completamente, es necesario que este mismo mecanismo de acilación-desacilación de la lipasa se repita dos veces más, con la transferencia de grupos acilo a los dos productos intermediarios, los diacilglicéridos y los monoglicéridos (Figura 27.II y III, respectivamente), para producir los correspondientes ésteres alcohólicos.

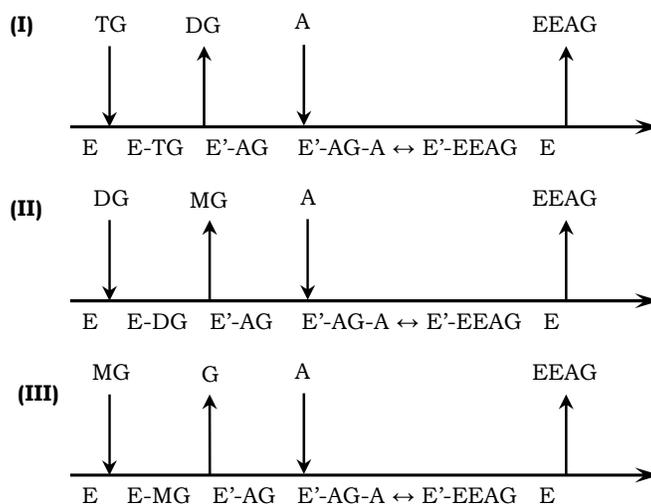


Figura 27. Representación gráfica de Cleland del mecanismo de alcoholólisis de aceite de ricino y etanol (E , enzima libre; A , etanol; TG , triglicérido; DG , diglicérido; MG , monoglicérido; AG , ácido graso; G , glicerol; $EEAG$, éster etílico de AG)

Por tratarse de un proceso que no involucra la formación de moléculas de agua, este es un buen modelo de reacción para analizar el efecto de la actividad de agua sobre el comportamiento de Novozym 435 en el sistema extracción/reacción en fluido supercrítico.

Las lipasas, como cualquier enzima, pueden llegar a inactivarse en ausencia completa de agua, pero se ha demostrado que una cantidad muy baja de agua es necesaria para que una enzima permanezca activa (Zaks & Klibanov, 1988). Para este caso, la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada, permaneció activa y con buena capacidad de transesterificación después de haber sido sometida a un proceso de liofilización para alcanzar una A_w inicial de 0.018. Es probable que a pesar del proceso de liofilización, el soporte retuviera una fracción mínima de agua, proporcionándole un microambiente adecuado de trabajo para la lipasa (Valivety et al., 1992), aunque este no haya sido el más propicio.

Para el presente estudio, en la Figura 28 se observa que conforme la actividad de agua aumenta, la velocidad inicial aparente de reacción es favorecida, alcanzando un máximo a una A_w inicial igual de 0.365.

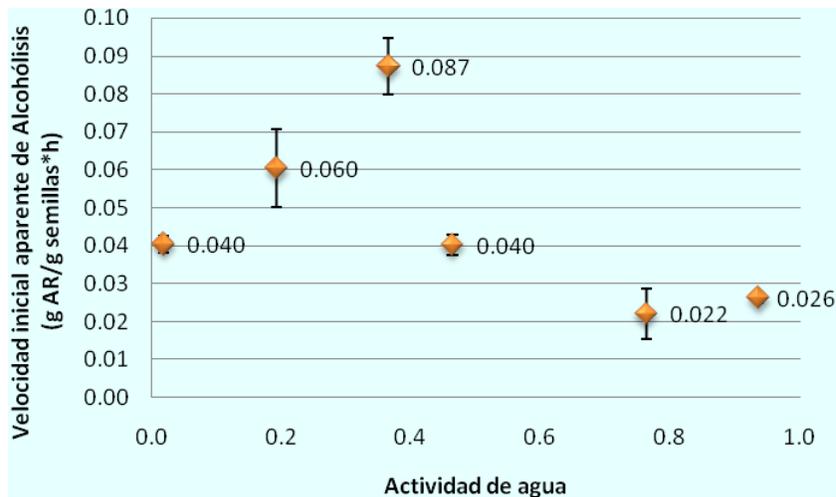


Figura 28. Velocidad inicial aparente de alcoholisis con respecto a la actividad de agua inicial de sustratos y catalizador en el sistema extracción/reacción en ScCO₂ a 70°C, 350bar, 130rpm, 0.083min.

El rendimiento final de transesterificación a las tres horas de reacción, también incrementó encontrando un comportamiento similar y máximo para los sistemas con A_w inicial de 0.193 y 0.365 (Figura 29).

A partir de una A_w inicial igual a 0.3, tanto la rapidez inicial de alcoholísis enzimática, como el rendimiento de reacción disminuyeron. Esta dependencia de la reacción con el A_w catalizada por una lipasa concuerda con estudios previos (Wehtje & Adlercreutz, 1997; Ma et al., 2002). Esto posiblemente se deba al efecto competitivo entre el agua y el etanol, para la reacción con el intermediario acil-enzima.

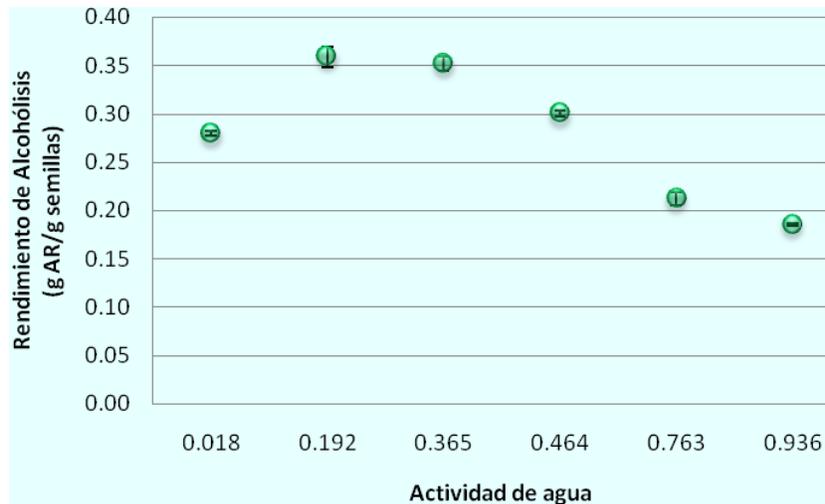


Figura 29. Efecto de la actividad de agua inicial en la reacción de alcoholísis catalizada por Novozym 435, dentro del sistema extracción/reacción en ScCO_2 a 70°C , 350bar, 3h y 130rpm.

A nivel molecular, la adsorción de agua implica una distribución uniforme del agua sobre el soporte y entre las moléculas de proteína inmovilizadas en él. Según McMinn *et al.*, (1993) el proceso de hidratación de una proteína puede ser caracterizado por una adsorción jerárquica, en la cual los sitios con grupos ionizables son los primeros en hidratarse, seguidos de los sitios moderadamente polares y por último los sitios no polares. Este concepto puede estar mejor definido por la isoterma de adsorción de agua para Novozym 435, reportada por Chamouleau (2001) (Figura 30), donde la parte cóncava representa la rápida hidratación de los grupos altamente polares; seguida por una monocapa de moléculas de agua hasta aproximadamente un valor de A_w de 0.7; y finalmente la hidratación llega hasta la formación de capas secundarias de agua, donde el aumento de las fuerzas intermoleculares permiten la condensación de las moléculas de agua (Beckett, 1995)

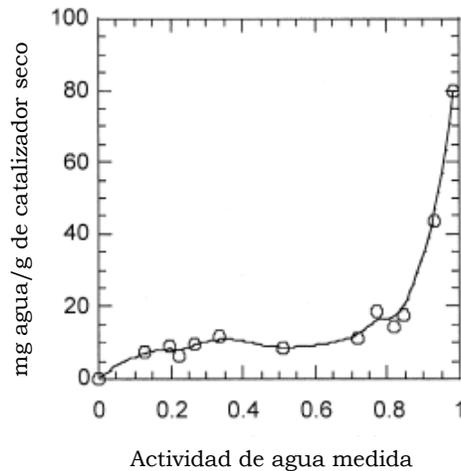


Figura 30. Curva de adsorción de agua para Novozym 435 a 20°C (Adaptada de Chamouleau et al., 2001)

Con base en los razonamientos anteriores, se puede explicar la reducción de la rapidez inicial de reacción a partir de la A_w igual a 0.464. Conforme la actividad de agua inicial se incrementó, las moléculas de agua pudieron formar capas de hidratación secundarias adsorbidas cerca del sitio activo de la lipasa, obstruyendo la región de enlace del sustrato a la enzima y, por tanto, dificultar su conversión, o simplemente favorecer la reacción enzimática de hidrólisis.

La cantidad de ácido ricinoleico obtenido durante la extracción (Figura 22) a diferentes valores de actividad acuosa inicial, muestran rendimientos de extracción similares. Sin embargo, no resultó así para los rendimientos de reacción puesto que la cantidad de ácido ricinoleico que reaccionó enzimáticamente con etanol fue diferente (Figura 29).

En el caso del sistema con A_w inicial igual a 0.018, la conversión enzimática del ácido ricinoleico extraído con ScCO_2 a su correspondiente éster etílico de ácido ricinoleico, fue del 77.20% en peso. En un sistema no acuoso con una A_w fija, los disolventes no polares incrementan la cantidad de agua enlazada por la enzima, mientras que los disolventes polares reducen esa cantidad de agua adsorbida a la enzima, formando parte de capas secundarias de hidratación (Adlercreutz, 1996). El empleo de etanol en el sistema, fue aprovechado no solo como sustrato de la reacción, sino también como cosolvente del fluido supercrítico. Este disolvente polar pudo reducir la cantidad de agua adsorbida al catalizador por secuestro del agua enlazada a la

proteína por su alta solubilidad, o por su capacidad de interactuar con la enzima mediante puentes de hidrógeno y ocupar parcialmente las capas secundarias de hidratación (Gorman & Dordick, 1992).

Para los sistemas con A_w inicial de 0.193 y 0.365, se encontraron los máximos de conversión del 94.08 y 93.14% en peso, respectivamente. Lo que indicó un amplio espectro de actividad catalítica para Novozym 435 en este sistema.

Se observó que a partir de una A_w inicial de 0.464 (con un 82.57% conversión), se detectó un descenso en el rendimiento de reacción conforme los niveles de actividad de agua inicial iban aumentando. Para el sistema con actividad acuosa inicial de 0.763 se halló una conversión máxima del 60.05%, y con el A_w inicial igual a 0.936 solamente se obtuvo el 48.70% de conversión del ácido ricinoleico. Conforme la actividad de agua inicial en el sistema aumentaba, también lo hacían las moléculas de agua alrededor del catalizador según la isoterma de adsorción reportada por Chamouveau *et al.*, (2001). Esto posiblemente causó la formación de una barrera hidrofílica en las vecindades del sitio activo, dificultando así los procesos de transferencia de masa, como lo es el paso de sustrato al centro activo de la enzima. Novozym 435 es una hidrolasa capaz de emplear al agua o al etanol como segundo sustrato nucleofílico, para que reaccione con el complejo enzima-acilo formado en la primera fase de la reacción. Por lo tanto ambos nucleófilos actúan de manera competitiva por el sitio activo de la enzima. Cuando la actividad de agua es incrementada, las moléculas de agua alrededor del catalizador posiblemente están en mayor proporción que el etanol, lo que le permite actuar como sustrato favoreciendo la actividad hidrolítica de la lipasa, o bien formar un complejo terminal intermediario enzima-acilo que inhiba la reacción (Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001; Chowdary & Prapulla, 2002)

6.7. Efecto asociado al etanol en el sistema extracción/reacción en ScCO_2 .

Con base en la capacidad que tienen las lipasas para llevar a cabo tanto reacciones de hidrólisis como de transferencia de grupo, se realizó una sencilla evaluación del efecto que presentaba la cantidad de etanol en el sistema. Para ello, se trabajó con una cantidad de etanol más baja (4% vol.) y otra más alta (10% vol.) a la utilizada en los experimentos anteriores.

Para el proceso de extracción no se detectó cambio en el perfil de solubilidad del aceite de ricino. El etanol siguió cumpliendo su función de cosolvente del fluido supercrítico, incrementando propiedades de transferencias de masa, las interacciones intermoleculares entre sustrato y fluido, su densidad y por tanto la solubilidad del sustrato (Figura 31).

En lo que concierne al efecto sobre la transesterificación, se evidenció una alta sensibilidad de la reacción a variaciones en la proporción de etanol en el sistema (Figura 31). Cuando se añadió el 4% del volumen total del sistema solamente se encontró un 36.58% de conversión del ácido ricinoleico a su correspondiente éster etílico. Probablemente porque la cantidad de etanol no fue la suficiente para cumplir ambas funciones de cosolvente y sustrato. Dentro del sistema supercrítico el etanol tiene una mayor afinidad por el fluido, por lo que permanece en el medio desempeñándose como coadyuvante del ScCO₂ en la solubilización del aceite de ricino y no como sustrato de la reacción. Las interacciones entre el etanol y el ScCO₂ se basan en la formación de un complejo estable donante-aceptor de electrón, más que en la configuración de puente de hidrógeno. En una mezcla supercrítica, las moléculas de CO₂ distribuidas alrededor de las moléculas etanol, están orientadas hacia la nube electrónica del átomo de oxígeno del etanol (*Saharay & Balasubramanian, 2006*). Si tomamos en cuenta que la cantidad de etanol en el seno del reactor es menor, éste tipo de complejo de transferencia de carga es el que gobierna el medio supercrítico, impidiendo que el etanol interactúe alrededor del sitio activo de la lipasa.

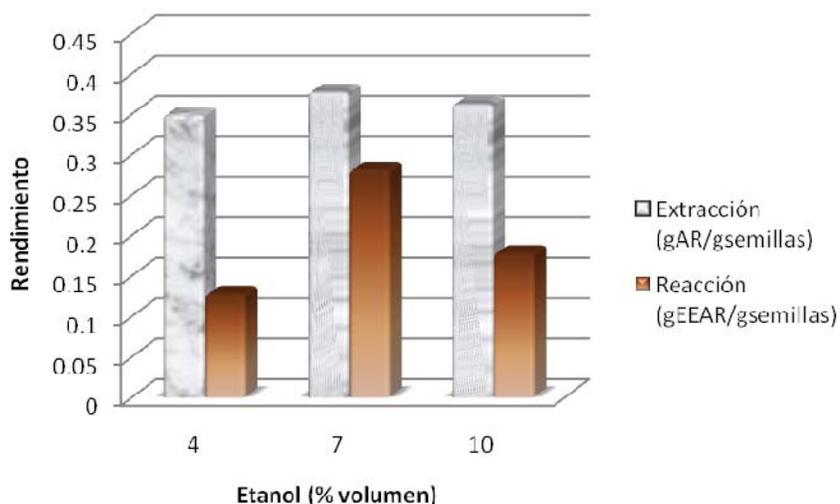


Figura 31. Efecto del etanol en el sistema extracción/reacción en ScCO₂ con A_w inicial 0.4, 70°C, 350bar, 3h y 130rpm.

Con relación a la adición de una mayor cantidad de etanol (10% volumen) al sistema extracción/reacción, también se observó una disminución en el rendimiento de transesterificación (49.09% de conversión). Una explicación a la disminución del rendimiento de transesterificación es que una mayor cantidad de etanol en el sistema posiblemente causó una inhibición por sustrato (Figura 32), comportamiento observado principalmente con alcoholes de cadena corta, como se ha reportado anteriormente (Ramamurthi & McCurdy, 1994; Bousquet-Dubouch et al., 2001).

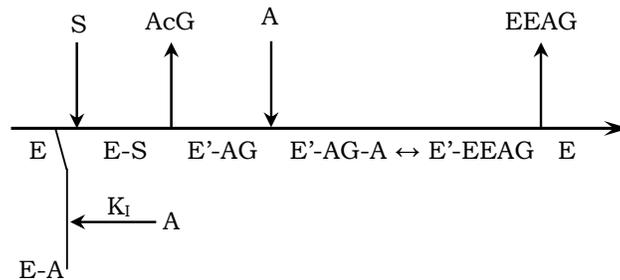


Figura 32. Representación gráfica de Cleland del mecanismo general de alcoholisis enzimática y su posible inhibición por etanol. (Nomenclatura: E, enzima libre; S, sustrato; AcG, acilglicérido; A, etanol; AG, ácido graso; E'-, intermediario acil-enzima G, glicerol; EEAG, éster etílico del ácido graso)

Otra causa posible, es que el etanol en el sistema puede cambiar la polaridad de la fase supercrítica provocando una distribución del agua hacia el ScCO₂. Lo que podría resultar en una inhibición del catalizador por la remoción de agua debido a la naturaleza hidrofílica del etanol (Goddard et al., 2000).

7. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

Se determinó la composición química general de las semillas de ricino que sirvieron de materia prima para el presente estudio. Se caracterizaron los aceites de ricino obtenidos a partir de una técnica convencional con disolvente orgánico (extracción Soxhlet) y otra empleando dióxido de carbono supercrítico (ScCO₂) como disolvente; encontrando que los parámetros de índice de saponificación, de yodo y de acidez están dentro de los intervalos establecidos, indicando una calidad química similar.

Se evaluaron procesos de extracción de aceite de ricino con diversas condiciones de temperatura y presión, bajo cuatro densidades diferentes del fluido supercrítico. Se definió que el proceso a condiciones de 70°C y 350bar de presión, con densidad de fluido de 0.8g/mL, eran los parámetros más favorables para obtener el mayor rendimiento de extracción de aceite de ricino (98.25% extracción de AR) en un menor intervalo de tiempo (2.5 horas).

La extracción se operó a un sistema conjunto de obtención de triglicéridos de aceite de ricino y transesterificación enzimática con etanol, en fluido supercrítico. El análisis de la extracción de aceite de ricino indicó que el etanol, además de haber cumplido su función de sustrato en la reacción de transesterificación, actuó como cosolvente del ScCO₂. Este efecto del cosolvente influyó directamente sobre las propiedades del fluido supercrítico, lo que contribuyó con la mejora de la transferencia de masa y la solubilidad de lípidos. Lo anterior redundó en el aumento de la rapidez inicial aparente de extracción de aceite (de v_i promedio de 0.212g AR g⁻¹ semillas h⁻¹ sin etanol, a $v_i=0.809$ g AR g⁻¹ semillas h⁻¹ con etanol).

La actividad de agua inicial de sustratos y catalizador en la alcoholólisis catalizada por Novozym 435 tiene un efecto múltiple dentro del sistema extracción/reacción en CO₂ supercrítico. No solo se encarga de la hidratación y el desempeño catalítico de la enzima, sino actúa como puente de interacción entre los sustratos y el medio. Para este sistema en particular, la lipasa B de *Candida antarctica* tuvo un mejor rendimiento de alcoholólisis a actividades de agua inicial entre 0.1 y 0.3 (94.08 y 93.14% de conversión, respectivamente). Conforme el A_w inicial se incrementó (hasta $A_w=0.9$), la lipasa disminuyó su actividad de transferencia de grupos acilo (48.70% de conversión), posiblemente debido a la participación directa del agua como sustrato en reacciones secundarias de hidrólisis, catalizadas por la misma enzima.

La actual investigación sobre el efecto de la actividad de agua inicial en la reacción de transesterificación enzimática, ayuda a descifrar una de las funciones del agua como fenómeno fisicoquímico que participa en este tipo de bioconversiones, lo que posiblemente contribuye a minimizar las reacciones secundarias de hidrólisis.

El potencial de esta aplicación biotecnológica es la obtención de derivados ésteres de ácidos grasos a partir de una materia prima renovable, aunada al empleo de enzimas y fluidos supercríticos como parte del sistema conjunto de extracción/reacción, que ha sido probado con éxito en el desarrollo de nuevos productos mediante una bioconversión respetuosa del medio ambiente.

8. PERSPECTIVAS DE TRABAJO

- Determinar el parámetro de solubilidad de la mezcla ternaria entre aceite de ricino/etanol/CO₂ supercrítico, que permita la factibilidad de llevar a cabo el sistema extracción/reacción de una manera más favorable.
- Evaluar la respuesta de Novozym 435 a diferentes concentraciones de sustratos, con la finalidad de obtener parámetros cinéticos confiables (tales como la constante de Michaelis-Menten, K_m ; velocidad de reacción, V_{max} ; y la constante de especificidad k_{cat}/K_m) que permitan discernir sobre el progreso de la reacción enzimática y su posible inhibición por sustrato en el sistema supercrítico.
- Evitar cualquier exceso de agua que pudiese modificar las propiedades del fluido supercrítico y el ambiente de la enzima, que ayudará a establecer el efecto verdadero de la actividad de agua en el sistema extracción/reacción. Lo anterior podría lograrse mediante la implementación de pre-columnas de tamiz molecular colocadas a la entrada del dióxido de carbono (disolvente) y el etanol (cosolvente y sustrato).

ANEXO I

I.A. Curva patrón para éster etílico de ácido ricinoleico.

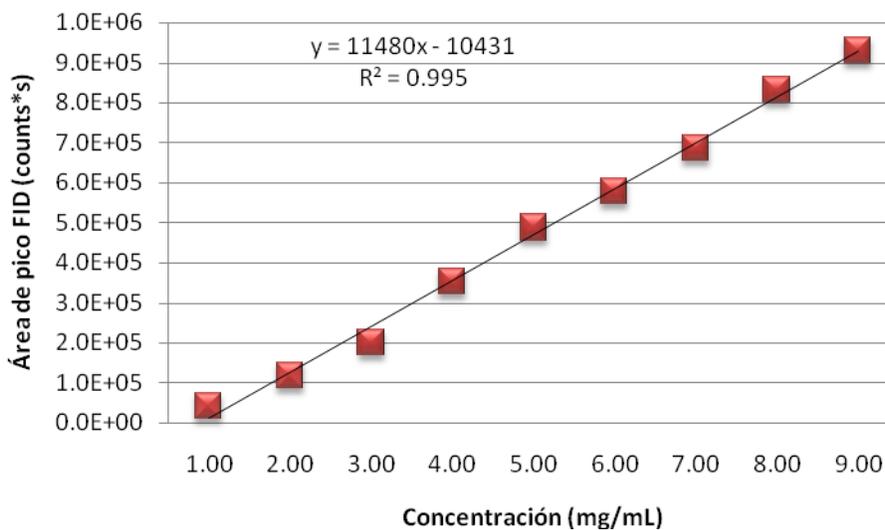


Figura I.A. Curva estándar de éster etílico de ácido ricinoleico obtenida por cromatografía de gases (Columna capilar Carbowax 20M, inyector a 210°C y detector FID a 220°C)

I.B. Curva patrón para éster etílico de ácido ricinoleico silanizado.

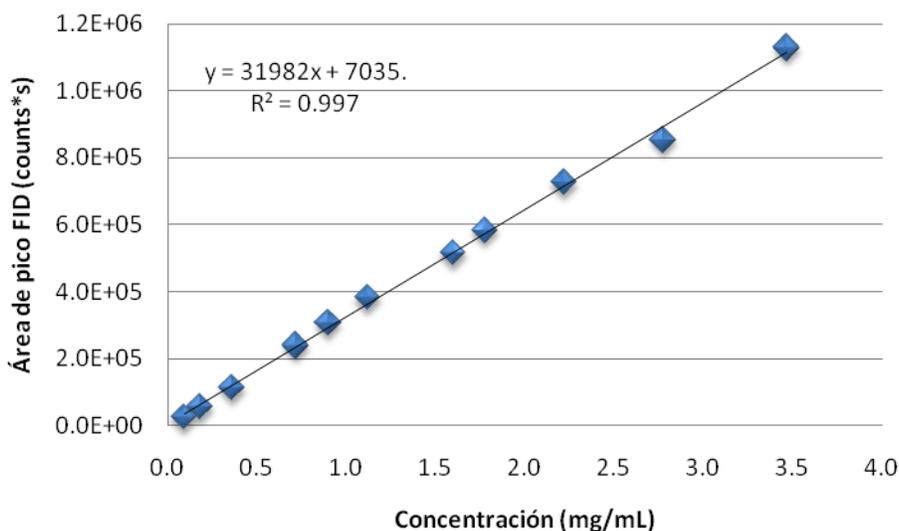


Figura I.B. Curva estándar del éster etílico de ácido ricinoleico silanizado, obtenida por cromatografía de gases (Columna DB-5HT de 5%-fenil-metilpolisiloxanos; inyector 350°C y detector 380°C)

ANEXO II

Metodología para determinación de actividad enzimática

Transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol. Se preparó una solución de acetato de vinilo (866mM) y 1-butanol (524mM) en hexano. En un matraz Erlenmeyer de 25mL con tapón de rosca, se colocaron 12.5mL de la solución anterior y 50mg de Novozym 435. En otro matraz con las mismas características se colocaron 12.5mL de solución y se empleó como control de la reacción. Los matraces se incubaron en un baño de agua a 45°C y 210rpm, obteniéndose muestras cada 2 minutos durante un lapso de tiempo de 10 minutos. Posteriormente, las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases, empleando una columna Carbowax 20 M (HP-20M) de 25m de longitud, 0.32mm de diámetro interno y 0.3µm de grosor de película; con detector de ionización de flama (FID) y operado en un modo split. La columna se mantuvo a 35°C por tres minutos, y se llevó hasta 85°C en un proceso isotérmico de 10°C min⁻¹. La temperatura del inyector y detector fueron mantenidas a 110 y 140°C, respectivamente. Se inyectó 1µL de cada una de las muestras por triplicado.

La cuantificación del producto de reacción fue determinado mediante una curva patrón de acetato de butilo (Figura II.A.).

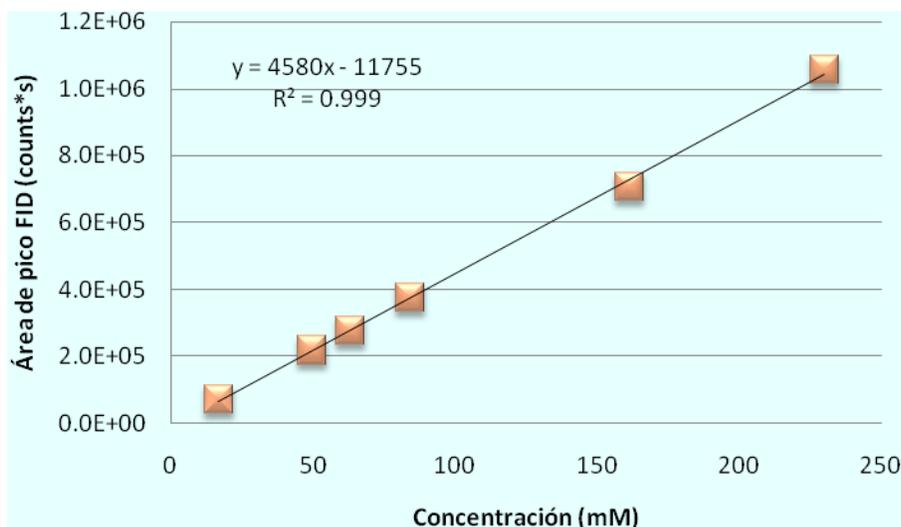


Figura II.A. Curva estándar de acetato de butilo obtenida por cromatografía de gases (Columna capilar Carbowax 20M, inyector a 110°C y detector FID a 140°C)

La actividad catalítica de Novozym 435 se calculó a un tiempo de 4 minutos, debido a que la concentración varía de manera ordenada y lineal hasta ese punto, utilizando la pendiente de la regresión lineal de los primeros tres puntos y la cantidad de catalizador empleada en el sistema. La actividad enzimática se definió como se describe a continuación:

$$Actividad = \frac{\mu M}{\text{min} \bullet \text{mg}}$$

Los datos de actividad catalítica se compararon con el resultado reportado para una reacción entre acetato de vinilo y n-octanol catalizada por la misma lipasa comercial, con un valor de actividad catalítica de $11.3 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Yadav & Trivedi, 2003).

Se realizaron las determinaciones de actividad al biocatalizador antes y después de ser empleado en el sistema de extracción/reacción. Las determinaciones de actividad catalítica encontrados en este trabajo se muestran en la Tabla VI, encontrando valor similares con respecto a datos reportados.

Tabla VI. Resultados de la determinación de actividad catalítica de Novozym 435.

Actividad de agua inicial	Actividad catalítica de Novozym 435 ($\mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	
	ANTES	DESPUÉS
0.015	10.5659	10.7218
0.115	11.0498	11.1234
0.338	11.4225	11.8420
0.467	11.6648	11.5450
0.746	10.4828	10.7873
0.939	9.1193	9.2351

8. REFERENCIAS

- Adlercreutz, 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
- Adlercreutz, P. (1996) Chapter 2 Modes of using enzymes in organic media. In: *Enzymatic reactions in organic media*. Koskinen, AMP; Klibanov, AM. Blackie Academic & Professional. First edition. Great Britain. Pág. 9-42
- Akoh, CC; Min, DB. (2002) *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Second edition. Marcel Dekker, Inc. USA
- Akoh, CC; Lee, GC; Liaw, YC; Huang, TH; Shaw, JF. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.*, 43:534-552
- Almeida, MC; Ruivo, R; Maia, C; Freire, L; Corrêa de Sampaio, T; Barreiros, S. (1998) Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects. *Enz. Microb. Technol.*, 22:494-499
- AOAC (Association of Official Methods of Analysis) (1995) *Official Methods of Analysis of Oils and Fats*. Chapter 41. 16th Edition. AOAC International, Gaithersburg, MD
- Beckett, ST. (1995) Chapter 1 Vapour Pressure and water activity. En: *Physico-chemical aspects of food processing*. First edition. Chapman & Hall. Great Britain. Pág. 1-15
- Bell, G; Halling, PJ; Moore, BD; Partridge, J; Rhees, G. (1995) Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.*, 13:468-473
- Blatchford, MA; Raveendran, P; Wallen, SL. (2003) Spectroscopic studies of model carbonyl compounds in CO₂: evidence for cooperative C-H...O interactions. *J. Phys. Chem. A*, 107:10311-10323
- Blaw, K; Halket, J: (1993) *Advances in silylation*. En: *Handbook of derivatives for chromatography*. Second Edition. John Wiley & Sons. England. Pág. 53-58
- Bousquet-Dubouch, MP; Graber, M; Sousa, N; Lamare, S; 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*, 1550:90-99
- Bozan, B; Temelli, F. (2002) Supercritical CO₂ extraction of flaxseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79:231-235
- Chamouleau, F; Coulon, D; Girardin, M; Ghoul, M. (2001) Influence of water activity content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 11:949-954
- Chowdary, GW; Prapulla, SG. (2002) The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.* 38:393-397

- Cuperus, FP; Boswinkel, G; Muuse, BG; Derksen, JTP. (1996) Supercritical carbon dioxide extraction of *Dimorphotheca pluvialis* oil seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:1675-1679
- Del Valle, JM; de la Fuente, JC; Cardarelli, DA. (2005) Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. *J. Food Eng.*, 67:35-57
- De Oliveira, D; Di Luccio, M; Faccio, C; Dalla Rosa, C; Bender, JP; Lipke, N; Menoncin, S; Amroginski, C; de Oliveira, JV. (2004) Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113-116:771-780
- De Oliveira, D; do Nascimento Filho, I; Di Luccio, M; Faccio, C; Dalla Rosa, C; Bender, JP; Lipke, N; Amroginski, C; Dariva, C; de Oliveira, JV. (2005) Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in *n*-hexane. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121-124:231-241
- Devittori, C; Gumy, D; Kusy, A; Colarow, L; Bertoli, C; Lambelet, P. (2000) Supercritical fluid extraction of oil from millet bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77:573-579
- Dumont, T; Barth, D; Corbier, C; Braniant, G; Perrut, M. (1992) Enzymatic reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:329-333
- Eder, K. (1995) Review. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.*, 671:113-131
- Fernández-Pérez, M; Otero, C. (2001) Enzymatic synthesis amide surfactants from ethanolamine. *Enz. Microb. Technol.*, 28:527-536
- Fontes, N; Harper, N; Halling, PJ; Barreiros S. (2002) Salt hydrates for In Situ water activity control have acid-base effects on enzymes in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.*, 82:802-808
- Fujii, A; Ebata, T; Mikami, N. (2002) Direct observation of weak hydrogen bonds in microsolvated phenol: Infrared Spectroscopy of O-H stretching vibrations of phenol-CO and CO₂ in S₀ and D₀. *J. Phys. Chem. A*, 106:10124-10129
- Gandhi, NN. (1997) Applications of lipase. Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74:621-634
- Goddard, R; Bosley, J; Al-Duri, B. (2000) Esterification of oleic acid and ethanol in plug flow (packed bed) reactor under supercritical conditions. *J Supercrit. Fluids*, 18:121-130.
- Gorman, LAS; Dordick, JS. (1992) Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:392-397
- Graber, M; Bousquet-Dubouch, MP; Lamare, S.; Legoy, MD. (2003) Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: effects of water on kinetic parameters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1648:24-32
- Greenspan L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Nat. Bur. Stand. (US)*, 81A:89-96

- Halling, PJ. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enz. Microb. Technol.*, 16:178-206
- Hammond, DA; Karel, M; Klibanov, AM. (1985) Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11:393-400
- Hayes, DG. (2004) Review. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81:1077-1103
- Holmquist, M (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzyme: structures, functions and mechanisms. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 1:209-235
- <http://faostat.fao.org/> Food and Agriculture Organization of the United Nations. En el sitio web "FAOSTAT": (Fecha de consulta: Mayo 2006)
- <http://www.micell.com/> Micell Technologies, Inc., Supercritical Fluid Technology, (Fecha de consulta: Diciembre 2006)
- http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comorgint.html Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Agricultura, Estadísticas. (Fecha de consulta: Mayo 2005)
- Hutchenson, KW. (2002) En: Supercritical fluid technology in materials science and engineering. Syntheses, properties, and applications. Editor Ya-Ping Sun. Marcel Dekker, Inc. USA. Pág. 87-101.
- Jackson, MA; King JW. (1997) Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74:103-106
- Kamat, SV; Beckman, EJ; Russel AJ. (1995) Enzyme activity in supercritical fluids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15:41-71
- King, JW. (2002) Supercritical fluid technology for lipid extraction, fractionation, and reactions. En: Lipid Biotechnology. Editores Tsung Min Kuo & Harold W Gardner. Marcel Dekker, Inc. USA Pág. 663-687
- Kishino, S; Ogawa, J; Ando, A; Omura, Y; Shimizu, S. (2002) Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:2283-2286
- Kirk-Othmer. (1979) Encyclopedia of Chemical Technology. Volume 5. John Wiley & Sons. Fourth Edition. United States of America pp 301-320
- Kirk-Othmer. (1998) Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Limusa. Primera edición. México. Pág. 8
- Kirk, RS; Sawyer, R; Egan, H. (2005) Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental. Segunda edición en español. Pág. 9-29
- Köse, O; Tüter, M; Ayşe Aksoy H. (2002) Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresour. Technol.*, 83:125-129
- Kuo, TM; Gardner, HW. (2002) Lipid Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. United States of America. Pág. 357-378

- Lanza, M; Priamo, WL; de Oliveira, JV; Dariva, C; de Oliveira, D. (2004) The effect of temperature, pressure, exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO₂. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113-116:181-187
- Luft, G; Recasens F; Velo E. (2001) Kinetic properties at high pressure. En: Industrial Chemistry Library, Volume 9. High pressure process technology: Fundamentals and applications. Editores Bertucco, A & Vetter, G. Elsevier Science. The Netherlands. Pág. 92-105
- Ma, L; Persson, M; Adlercreutz, P. (2002) Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enz. Microb. Technol.*, 31:1024-1029
- Macrae R; Robinson RK; Sadler MJ. (1993) *Encyclopedia of food science. Food technology and nutrition*. Academic Press Inc. United Kingdom. Pág. 4679-4710
- Marangoni, A; Rousseau, D. (1995) Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends Food Sci. Technol.*, 6:329-335
- Martinelle, M; Holmquist, M; Hult, K. (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B with compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258:272-276
- Matissek, R; Schnepel, FM; Steiner, G. (1998) Análisis de los alimentos. Fundamentos –Métodos- Aplicaciones. Editorial Acribia, Zaragoza. Pág. 45-54
- McMinn, JH; Sowa, MJ; Charnick, SB; Paulaitis, ME. (1993) The hydration of proteins in nearly anhydrous organic solvent suspension. *Biopolymers*, 33:1213-1224
- Michor, H; Marr, R; Gamse, T. (1996) Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: effect of water activity. *Process Technology Proceedings, (High Pressure Chemical Engineering)*, 12:115-120
- Nakamura, K; Chi, YM; Yamada, Y; Yano, T. (1985) Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Commun.*, 45:207-212
- Naughton, FC. (1993) Castor oil. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley. New York. Pág. 301
- Nelson, LA; Foglia, TA; Marmer, WM. (1996) Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:1191-1195
- Nilsson, WB; Hudson, JK. (1993) Solubility of simple and mixed triacylglycerols in supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70:749-754
- Novozymes México. (2005) Enzyme Material Safety Data Sheet for Novozym 435.
- Ogunniyi, DS. (2006) Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.*, 97:1086-1091
- OIML R 121 (1996) The scale of relative humidity of air certified against saturated salt solutions. Organisation Internationale de Métrologie Légale. France.
- Ollis, DL; Cheah, E; Cygler, M; Dijkstra, B; Frolow, F; Franken, S.M.; Harel, M; Remington, SJ; Silman, I; Schrag, J. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.*, 5:197-211,

- Overmeyer, A; Schrader-Lippelt, S; Kache, V; Brunner, G. (1999) Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40°C to 160°C in supercritical CO₂. *Biotechnol Lett.*, 21:65-69
- Peres, C; Gomes da Silva, MDR; Barreriros, S. (2003) Water activity effects on geranyl acetate synthesis catalyzed by Novozym in supercritical ethane and in supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1884-1888
- Ramamurthi, S; McCurdy, R. (1994) Lipase-catalysed esterification of oleic methanol in hexanol – a kinetic study. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71:927-930
- Randolph, TW; Blanch, HW; Prausnitz, JM; Wilke CR. (1985) Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.*, 7:325-328
- Raventós, M; Duarte, S; Alarcón R. (2002) Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. *Food Sci. Tech. Int.*, 8:269-284
- Reyes, HR; Hill, CG. (1993) Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, 43:171-182
- Rhee, KC. (2001) Determination of Total Nitrogen. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons. Pág. B1.2.1-B1.2.3
- Rizvi, SSH. (1994) Supercritical fluids processing of food and biomaterials. Chapman & Hall. Great Britain. Pág. 1-4
- Rossell, JB; Ptichard, JRL. (1991) Analysis of oilseed, fats and fatty acids. Elsevier Applied Science. London. Pág. 80
- Saeed, HM; Zaghloul, TI; Khalil, AI; Abdelbaeth, MT. (2005) Purification and characterization of two extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* Ps-x. *Pol. J. Microbiol.*, 54:233-240
- Saharay, M; Balasubramanian, S. (2006). Electron donor-acceptor interactions in ethanol-CO₂ mixtures: an ab initio molecular dynamics study of supercritical carbon dioxide. *J. Phys. Chem. B Condens. Matter Mater. Surf. Interfaces Biophys.*, 110:3782-90
- Seriburi, V; Akoh, C. (1998) Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75:1339-1345
- Schmid, R; Verger, R. (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Ind. Ed.*, 37:1608-1633
- Shahidi, F. Extraction and Measurements of Total Lipids. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons. Pág. D1.1.1-D1.1.3
- Sihvonen, M; Järvenpää, E; Hietaniemi, V; Huopalahti, R. (1999) Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends Food Sci. Technol.*, 10:217-222
- Taylor, L. (1996) Supercritical fluid extraction. John Wiley. New York, pp 9-20
- Turner, C; Whitehand, LC; Nguyen, T; McKeon, T. (2004) Optimization of supercritical fluid extraction/reaction methodology for the analysis of castor oil using experimental design. *J Agric. Food Chem.*, 52, 26-32

- Uppenberg, J; Hansen, MT; Patkar, S; Jones, TA. (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2:293-308
- Vakhlu, J. (2006) Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron. J. Biotechnol.*, 9:69-85.
- Valivety, RH; Halling, PJ; 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
- Valivety, RH; Halling, PJ; Peilow, AD; Macrae, AR. (1994) Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. Effects of supports, loading and enzyme preparation. *Eur. J. Biochem.*, 222:461-466
- Wehtje, E; Adlercreutz, P. (1997) Water activity and substrate concentration effect on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.*, 55:798-806
- Wells, S; DeSimone, J. (2001) CO₂ technology platform: an important tool for environmental problem solving. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40:518-527
- Yadav, GD; Trivedi, AH. (2003) Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enz. Microb. Technol.*, 32:783-789
- Yahya, A; Anderson, WA; Moo-Young, M. (1998) Esther synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enz. Microb. Technol.*, 23:438-450
- Yamamoto, M; Iwai, Y; Nakajima T; Arai, Y. (1999) FTIR Study on hydrogen bonding species of carboxylic acids in ScCO₂ with ethanol. *J. Phys. Chem. A*, 103:3525:3529
- Zaks, A; Klibanov, AM. (1988) The effect of water on enzyme action in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.*, 263:8017-8021