



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ACETATO DE 1-METOXI-
2-PROPANOL EMPLEANDO LAS LIPASAS DE
Burkholderia cepacia y LIPASA B de *Candida antarctica*
INMOVILIZADA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
KARINA HERMOSO BERRUECOS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

Presidente: Saldivar Osorio Liliana

Vocal: Aguilar Caballero Raul

Secretario: Gimeno Seco Miquel

Suplente 1: Hernandez Garciadiego Lucia

Suplente 2: Perez Munguia Sandra

La presente tesis de licenciatura se realizó en el laboratorio de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Laboratorio 314, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México 04510, D.F

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Gimeno Seco Miquel

SUSTENTANTE:

Karina Hermoso Berruecos



AGRADECIMIENTOS:

A Dios por permitirme llegar hasta este momento tan anhelado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química y a todos mis profesores por la formación recibida.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por su infinita paciencia y ayuda, por escucharme y por la gran oportunidad de estar en su laboratorio bajo su asesoría.

A Alberto y amigos del laboratorio por su paciencia y atención brindada durante la estancia en este.

Al honorable jurado por su tiempo, revisión y comentarios emitidos para el mejoramiento de esta tesis.

A todos mis amigos que me apoyaron, escucharon y dedicaron parte de su tiempo en mí.

A todas las personas que de alguna forma han contribuido al desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

Esta tesis representa mucho para mí y sé que también para mi familia, pero en especial agradezco a:

Dios, que siempre estuvo conmigo a lo largo de mi vida.

Mis padres, Jaime y María de la luz, porque me dieron todo lo necesario y muchísimo más de lo que unos padres pudieran dar, gracias a ellos sigo adelante y seguiré adelante por mucho tiempo, sin ustedes yo no sería lo que soy ahora, los amo hasta el infinito.

A mis hermanas Sandy y Alex, porque siempre dedicaron tiempo, paciencia, mucha paciencia y amor a Kary, porque siempre respetaban todo lo que hacía bueno o malo a lo largo de mi vida, las amo y gracias.

A mi abuelita que me dio mucho cariño y me demostraba siempre que se preocupaba por mí.

A toda mi familia mi abuelo, tíos, primos, sobrinos, etc.

A mis grandes amigas, Adriana, Monse, Aura, Mónica, Yanet, Mariana, Nancy, Sarahi; ellas que me ayudaron a lo largo de mi vida a forjarme como estudiante y como amiga.

A mis amigos, Rod pop, Poli, Mau, Luis, que siempre me ayudaron en las buenas y malas.

A mis grandes amores a Luch porque siempre me apoyo en todo, con su comprensión y amor me enseñó a ser feliz, deseando lo mejor para mí.

A Espinoza, porque me enseñó a ser responsable, tolerante.

A Bignoli porque me dio la oportunidad de seguir adelante, me enseñó a soñar y a valorar las pequeñas cosas de la vida para después pensar en un futuro más tranquilo.

A todas las personas que estuvieron presentes a lo largo de mi vida para llegar a este momento tan maravilloso, les agradezco muchísimo.

INDICE

Índice	5
Resumen	7
Capítulo 1. Introducción	8
Capítulo 2. Hipótesis y objetivos	9
2.1 Hipótesis	9
2.2 Objetivos generales	9
2.3 Objetivos particulares	10
Capítulo 3. Marco Teórico	10
3.1 Enzimas	10
3.2 Estructura de las enzimas	11
3.3 Desnaturalización de las proteínas	12
3.3.1 Desnaturalización por calor	13
3.3.2 Desnaturalización por disolventes orgánicos	13
3.4 Biocatálisis	14
3.5 Elección del biocatalizador	14
3.6 lipasas	15
3.6.1 Fuente y aplicación de las lipasas	16
3.6.2 Características, estructura y clasificación de las lipasas	17
3.7 Reacciones catalizadas por acción de las lipasas	21
3.8 Condiciones de reacción de síntesis en medio no acuoso catalizadas por lipasas	23
3.9 Propiedades del éster acetato de 1-metoxi-2-propanol (PMA)	24
3.9.1 Descripción del producto	24
3.9.2 Usos del PMA a nivel industrial	25
3.9.3 Producción de PMA	26
Capítulo 4. Metodología Experimental	27
4.1 Materiales y Métodos	27
4.1.1 Reactivos	27
4.1.2 Biocatalizadores	27

4.1.3	Equipos	28
4.2	Metodología	29
4.3	Primera etapa experimental. Desarrollo de la metodología analítica HPLC para la cuantificación de PMA	29
4.4	Cromatografía de líquidos de alta resolución	32
4.5	Preparación de muestras	32
4.6	Reacciones de esterificación utilizando el disolvente Ciclohexano	33
4.7	Esquema Experimental	33
Capítulo 5.	Resultados y discusiones	34
5.1	Efecto de la temperatura en la síntesis de esterificación Con lipasa PS	35
5.2	Síntesis de PMA con CAL-B	37
5.3	Efecto de la concentración de lipasa PS	38
5.4	Efecto de la concentración de la lipasa con CAL-B	39
5.5	Efecto de la concentración de sustrato en reacciones Empleando la lipasa PS	41
5.6	Efecto de la concentración de los sustratos para la Esterificación con CAL-B	42
5.7	Influencia de diferentes biocatalizadores	43
5.8	Tercera parte experimental. Análisis de costos	44
5.8.1	Costos por cada lipasa	45
Capítulo 6.	Conclusiones	46
Capítulo 7.	Bibliografía	47

RESUMEN

El éster de acetato de 1-metoxi-2-propanol (PMA) se utiliza a nivel industrial como disolvente de resinas, pinturas, recubrimientos automotrices, productos para el hogar, lacas, barnices y plaguicidas. Este trabajo ofrece un método de síntesis enzimática alternativa para la obtención del éster (PMA) en condiciones más suaves y ecológicas, en el cual se utilizaron las lipasas como catalizadores, debido a que estas son una fuente renovable y reutilizable, evitando así los procesos químicos tóxicos.

Las lipasas que se emplearon, son obtenidas de *Burkholderia cepacia* (lipasa PS) y lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada “Novozym 435”, debido a su alta actividad catalítica en medios no acuosos, lo cual permite la síntesis de ésteres. El medio de reacción que se utilizó fue el ciclohexano, y como sustratos ácido acético y 1-metoxi-2-propanol.

Se evaluaron las relaciones de concentración de los sustratos, la concentración del biocatalizador, y la temperatura de reacción, esto con el fin de optimizar dichos parámetros y para poder alcanzar el rendimiento más alto del producto de reacción (PMA).

Al utilizar la lipasa PS el rendimiento alcanzado fue del 40.8% a las 26 h de reacción, con una relación equimolar de los sustratos de 0.5 mol/L, 5g de lipasa y una temperatura de 60 °C, posteriormente al utilizar Novozym 435 el rendimiento alcanzado fue del 42.2 % a las 4 h de reacción con una relación equimolar de los sustratos de 0.5 mol/L, 2g lipasa, y una temperatura de 60 °C. Los resultados demostraron que el tiempo de reacción y el contenido del biocatalizador fueron menores para Novozym 435 que para la lipasa PS, esto ayudara y facilitará aún más la optimización económica del proceso antes de aumentar la escala a una producción industrial.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas se utilizan cada vez más como catalizadores en síntesis, entre ellas las lipasas, las cuales pertenecen a la familia de las hidrolasas que son de aplicación industrial. (G.N. Kraai y col., 2008, p.87-97). En su estado natural, las lipasas catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster presentes en los triacilglicéridos produciendo ácidos grasos libres y glicerol.

(Mora, 2008, p.3).

Entre sus principales características podemos mencionar su amplia variedad para catalizar reacciones de esterificación, transesterificación, alcoholisis, aminólisis, acidólisis e hidrólisis. Sin embargo, a pesar de sus extraordinarias posibilidades sintéticas y con el fin de ampliar la aplicación de las lipasas, hay algunos problemas que deben ser resueltos en relación con su actividad catalítica y termodinámica. (Cao y Yang, 2004, pp. 177-182), (Yadav y Lathi, 2006, pp. 814-820).

La producción de acetato de 1-metoxi-2-propanol a nivel industrial es realizada a través de procesos químicos tóxicos, y en general dañinos para el medioambiente por lo que el empleo de biocatalizadores es una gran alternativa para disminuir el impacto ecológico.

Lipasas obtenidas de *Burkholderia cepacia* (lipasa PS) en su forma libre y lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada “Novozym 435” sobre un soporte acrílico poroso son propuestas en este proyecto debido a su alta actividad catalítica en medios no acuosos, lo cual permite la síntesis de ésteres. (Kenthorai y Pogaku, 2009, p.78-79).

Las condiciones de reacción para las síntesis de ésteres se seleccionaron tomando en consideración la estabilidad de la lipasa, que presenta una actividad óptima en un rango de temperaturas (30-70°C), también se consideraron los resultados reportados por (Bartling 2001, p. 75, 676-681) que han demostrado que la esterificación enzimática de alcoholes con ácido acético es factible y se puede llevar a cabo a temperaturas moderadas (30-70°C) y a presión atmosférica.

PMA (acetato de 1-metoxi-2-propanol) es un disolvente de resinas y tintas que no son compatibles con agua, se utiliza con acrílicos, resinas epóxicas, resinas

alquídicas, poliésteres, y otros tipos de resinas, a nivel industrial este producto se emplea en pinturas y recubrimientos automotrices, productos para el hogar, pinturas, lacas, barnices y plaguicidas. Los disolventes de éteres de glicol, son muy potentes y se utilizan generalmente en recubrimientos y en procesos químicos. Los disolventes de glicol éter son relativamente nuevos y han sido diseñados como alternativa menos tóxica a los de etilenglicol. El esquema de la reacción biocatalizada involucrada en la consecución del producto acetato de 1-metoxi-2-propanol está descrita en la Figura 1.

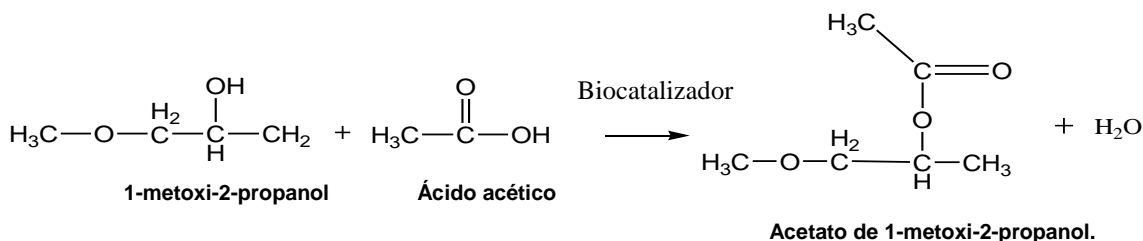


Figura 1.1 Esquema de la reacción enzimática en la producción del acetato de 1-metoxi-2-propanol.

Capítulo 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

El uso de las enzimas lipasa de *Burkholderia cepacia* libre y Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en un medio no acuoso permitirá la síntesis de acetato de 1-metoxi-2-propanol.

2.2 OBJETIVO GENERAL:

Evaluación del uso de lipasas de *Burkholderia cepacia* libre y lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en la reacción de síntesis de acetato de 1-metoxi-2-propanol.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Establecer el método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del producto.
- Determinación de las condiciones óptimas de la reacción de esterificación enzimática con la enzima de las lipasas, *Burkholderia cepacia* y lipasa B *Candida antarctica* inmovilizada.

Capítulo 3. MARCO TEÓRICO

3.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas que poseen actividad catalítica. (H. D. Belitz, 1991, p.105). Las enzimas tienen un gran potencial; para ser usadas como reactivos en síntesis, puesto que catalizan reacciones estereoespecíficas en condiciones suaves y porque transforman un amplia gama de substratos en la reacción y dan lugar a pocos o a ningún subproducto.

Las enzimas presentan las siguientes características generales.

- 1.- Son un recurso natural biorenovable
- 2.- No son tóxicas.
- 3.- Tienen alta especificidad.
- 4.- Las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hacen que el proceso productivo tenga relativamente bajo costo. Además, los adelantos en diversas áreas han permitido que las enzimas tengan más aplicaciones debido a los puntos que se enumeran a continuación:
- 5.- Se pueden producir más fácilmente y en cantidad, no como hace 50 años mediante técnicas genéticas.

6.- Se pueden reutilizar mediante técnicas de inmovilización.

7.-Se pueden realizar reacciones de síntesis en varios pasos. (Quintero, 1990, p.11-12).

La especificidad estructural de las enzimas puede utilizarse para producir reacciones regioespecíficas o selectivas en moléculas que poseen dos o más funciones similares químicamente, con una facilidad que en algunos casos es difícil de duplicar vía otras rutas químicas.

La estereoespecificidad absoluta de las enzimas es un hecho destacable, y su capacidad para discriminar entre enantiómeros y grupos estereoheterotrópicos es de gran valor para la síntesis enantioselectiva. (Wiseman, 1991, p. 305-306).

3.2 Estructura de las enzimas

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo*.

La estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos. Su función depende de la estructura tridimensional que se ve estabilizada específicamente por medio de interacciones no covalentes. La estructura primaria incluye todos los enlaces covalentes entre aminoácidos; y viene normalmente definida por la secuencia de los aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y la localización, en algunos casos, de puentes disulfuro.

La estructura secundaria se refiere a las disposiciones regulares y repetitivas en el espacio de residuos aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Existen clases básicas de estructuras secundarias, siendo las más importantes la hélice α y la conformación β .

La estructura terciaria es la descripción de las relaciones espaciales entre todos los aminoácidos de un polipéptido, o dicho de otro modo, su estructura tridimensional completa. La estructura tridimensional de una proteína de tamaño grande contiene a menudo varios tipos diferentes de estructura secundaria.



Estructura cuaternaria que se refiere a la relación espacial de los polipéptidos o subunidades en la proteína global.

Las proteínas globulares comprenden un grupo diferente en su estado nativo, que aparecen como moléculas esféricas compactas, por ejemplo las hidrolasas en concreto las lipasas; de *Burkholderia cepacia* y lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) que se usarán en este trabajo.

3.3 Desnaturalización de las proteínas

La conformación de una proteína está ligada a su estructura secundaria y terciaria, estas estructuras son lábiles donde pueden sufrir una desnaturalización. Por desnaturalización protéica se entiende cualquier modificación de la conformación (secundaria, terciaria o cuaternaria) que no haya acompañado de la ruptura de enlaces peptídicos, implicados en la estructura primaria. Por ello el tratamiento de las proteínas con ácidos, álcalis, disoluciones salinas concentradas, disolventes, temperaturas elevadas y radiaciones, puede desnaturalizarla. Ciertas proteínas, están ya desplegadas en el estado nativo lo que explica su estabilidad frente a ciertos agentes desnaturalizantes, incluido el tratamiento térmico.

Los efectos de la desnaturalización protéica son múltiples, como se enumeran a continuación:

- 1.-El descenso de la solubilidad a consecuencia del desenmascaramiento de grupos hidrófobos.
- 2.- La modificación de la capacidad de fijación de agua.
- 3.- La pérdida de la actividad biológica.
- 4.- El incremento de la susceptibilidad al ataque por las proteasas, es a causa del desenmascaramiento de enlaces peptídicos, específicamente vulnerables a estas proteasas.
- 5.- El incremento de la viscosidad intrínseca.
- 6.- La incapacidad de cristalizar.

La desnaturalización puede ser reversible o irreversible. Cuando a la conformación de la proteína contribuyen enlaces disulfuro, y estos se rompen, la desnaturalización suele ser irreversible.

3. 3. 1 Desnaturalización por calor

El calentamiento es el agente físico más común en la desnaturalización de proteínas. La velocidad del proceso de desnaturalización depende de la temperatura; para muchas reacciones la dependencia de la velocidad respecto de la temperatura es tal que se duplica al aumentar ésta 10°C, pero en el caso de la desnaturalización protéica, la velocidad aumenta 600 veces por cada aumento de 10°C en el intervalo típico de la desnaturalización, a consecuencia de la escasa energía de las interacciones que estabilizan las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria.

La susceptibilidad de las proteínas a la desnaturalización por el calor depende de numerosos factores, como la naturaleza de la proteína, la concentración de la misma, la actividad de agua, el pH, la fuerza iónica y la naturaleza de los iones presentes.

3. 3. 2 Desnaturalización por disolventes orgánicos

La mayoría de los disolventes orgánicos pueden considerarse como agentes desnaturalizantes. Alteran la constante dieléctrica del medio y, por tanto, las fuerzas electrostáticas que contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Los disolventes orgánicos polares e hidrofílicos son capaces de promover la desnaturalización debido al efecto de barrido o “stripping” de las moléculas de agua del sitio activo de la enzima, las cuales son necesarias para mantener la estructura y por ende la actividad catalítica. (Fenema, 1995, p.306-312).

Las últimas investigaciones se han centrado en relacionar alguna propiedad fisicoquímica del disolvente con la selectividad enzimática, para así, poder racionalizar todos estos procesos biocatalíticos. Se sabe que el log P está relacionado con la lipofilia del disolvente y; por tanto, con la eliminación o mantenimiento de la monocapa de agua esencial de la enzima, mientras que la

constante dieléctrica del disolvente da una idea acerca de la flexibilidad de la lipasa en el disolvente.

De todos los parámetros que caracterizan a un disolvente orgánico: coeficiente de solubilidad de Hildebrand (δ), la constante dieléctrica (ϵ), el momento dipolar (μ) o el coeficiente de partición P ($\log P$) en el sistema n-octanol/agua.

Este último es el que ejerce una mayor influencia en la actividad catalítica de la enzima; así se ha podido comprobar cómo la actividad enzimática es baja en disolventes cuyo $\log P < 2$, moderada si $2 < \log P < 4$, y alta si el $\log P > 4$. Aquellos disolventes con un $\log P$ mayor de 4, no alteran la capa de agua esencial situada alrededor del biocatalizador, por lo que éste permanece activo.

3.4 Biocatálisis

El uso de enzimas por medio de microorganismos ha sido para beneficio de la humanidad y muy importante por siglos aun sin saber que existían, se han utilizado para la producción de pan, quesos, entre muchos otros. El incremento de la utilización de estas enzimas es debido a que en algunos casos, son de bajo costo (en comparación los catalizadores químicos convencionales) y son amigables con el medio ambiente. La utilización de biocatalizadores ha sumado grandes avances que se han dado en torno al conocimiento de técnicas moleculares, bioquímicas, y biotecnológicas lo que permite su manipulación y optimización de algunas enzimas. (Alatorre, 2006, p.5).

La catálisis enzimática se ha convertido en una técnica estándar en biotecnología con el uso de lipasas que representan el tipo de biocatalizadores siendo utilizados comúnmente en reacciones a nivel industrial, enfocándose a productos con alta pureza que son ambientalmente más benignos. (F. Hollmann y P. Grzebyk, 2009, pp. 257-261).

3.5 Elección del biocatalizador

Las dos características más destacadas de las enzimas, en su papel de catalizadores, son su alta actividad y su especificidad. Las ventajas que se

derivan de utilizar enzimas en una aplicación tecnológica es que puede elegirse aquella que reconozca exclusivamente a uno de los sitios activos dentro de una mezcla compleja. Por otro lado, cada enzima tiene un pH óptimo diferente y una estabilidad distinta frente a la temperatura, por lo que los problemas se multiplican cuando se planifica un proceso de síntesis que transcurre en varias etapas, en el que cada una de las mismas es catalizada por una enzima distinta. (Gacesa, 1998, p. 3-4).

3.6 Lipasas

Las lipasas son enzimas de la familia de las hidrolasas y su función es la de hidrolizar las grasas desdoblándolas en glicerol y ácidos grasos. Estas se han convertido recientemente en uno de los grupos más estudiados de enzimas. (Wu y Iamsa, 1998, pp. 41-50).

Las lipasas son enzimas que hidrolizan la unión éster de los triacilgliceroles, y se encuentran distribuidas en plantas, animales o microorganismos. Muchas de estas lipasas microbianas han sido purificadas y secuenciadas. En general son glicoproteínas que contienen entre 3 y 15% de glúcidos en su estructura, preferentemente manosa. Existen dos tipos de especificidad asociados a las lipasas; hacia el acilglicerol caracterizado por la hidrólisis preferencial hacia los triacilgliceroles de bajo peso molecular y al hidrolizar solamente el enlace éster del ácido graso en la posición 1 ó 2.

La característica principal de las lipasas es que su actividad es máxima solamente cuando la enzima actúa en la interface agua-aceite, propiedad conocida como activación interfacial.

Las lipasas son también capaces de catalizar la reacción inversa (Esterificación, Interesterificación y Transesterificación), siempre que el medio acuoso se sustituye por una orgánica o una bifásica acuosa / medio orgánico. Aunque la síntesis de ésteres puede ser químicamente catalizada por ácidos o bases, el uso de la tecnología de enzimas ofrece ventajas ambientales y una reducción en el consumo de energía.

Casi todas las lipasas tienen actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura; de 30°C y 70°C.

3. 6. 1 Fuente y aplicación de las lipasas

- Lipasas de origen microbiano: Se ha encontrado que la mayoría tienen su máxima actividad en un rango de pH 5.6-8.7 y de temperaturas entre 30°C y 70°C.
- Lipasas de origen vegetal: Son abundantes en los tejidos de reserva. Algunas semillas tienen actividad lipolítica elevada, debido a que deben cubrir los requerimientos energéticos a partir de las reservas de triglicéridos, pero no siempre están presentes en la semilla latente.
- Lipasas de origen animal: Se han hecho estudios en lipasas de mamíferos, principalmente porcinos y rata. Se encuentran en órganos y tejidos como páncreas, corazón, cerebro, arterias, riñón, tejido adiposo, sangre, orina y leche. (Miralles, 2000, p.7).

Tabla. 3.1 Aplicaciones industriales de lipasas (Alatorre, 2006, p. 12)

INDUSTRIA	REACCIÓN	APLICACIÓN
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Remoción de aceites en telas
Productos lácteos	Hidrólisis y modificación de grasa de leche, maduración quesos	Desarrollo de saborizantes en productos lácteos
Panadera	Mejora en sabor	Prolongación de vida de anaquel
Química	Enantioselectividad, síntesis	Química fina, productos intermediarios quirales.

Las principales razones del uso de las lipasas de microorganismos en la industria son:

1. Estables en solventes orgánicos
2. No requieren cofactores
3. Poseen una amplia especificidad de sustratos
4. Poseen una alta enantioselectividad

Tabla. 3.3 Lipasas de origen microbiano disponibles comercialmente.

Origen	Organismo productor	Aplicaciones Biotecnológicas	Comercializado por
Fúngico	Candida rugosa	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysis,Boehringer Mannheim.
	CAL A/B	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
Bacteriano	PS	Síntesis Orgánica	Amano, Fluka,Boehringer
	Chromobacterium viscosum	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysis

3.6.2 Características, estructura y clasificación de las lipasas.

Todas las lipasas tienen una estructura similar en su plegamiento, que corresponde a la hidrolasa α / β , que consiste en paralelo β -hilos flanqueada por α -hélices, y un sitio activo con una tríada catalítica que consiste de la Ser, Cys, y Asp / Glu y un residuo de histidina. La característica de la mayoría de las lipasas es que la activación de enlace sustrato/enzima la realizan en la interfaz hidrofóbica. La mayoría de las lipasas en la superficie contienen una tapa, que cubre el sitio activo. La tapa se abre en una interfase hidrofóbica, haciendo que el sitio sea accesible y activo para los sustratos. La actividad de la lipasa se lleva a cabo debido a que el interior de la tapa es hidrofóbica, lo que favorece la apertura de la tapa de las lipasas. Por lo tanto, en solventes no polares la conformación abierta es favorecida termodinámicamente.

Lipasa de *Burkholderia cepacia* (PS)

Burkholderia cepacia es un bacilo Gram negativo de 1.6-3.2 mm de longitud. Fue descubierto en 1949 por Walter Burkholder en la Universidad de Cornell en la descomposición cebollas. *B. cepacia* es un aerobio estricto y un quimiorganotrófico con una temperatura óptima de 30 a 35 °C. Puede ser utilizado como un agente de control biológico, ya que produce múltiples antibióticos contra los hongos patógenos de plantas. (Microbio, 2000).

Es un grupo de bacterias Gram negativas no fermentadoras, aerobias y productoras de catalasa, se encuentran en el suelo y el agua, esta bacteria es muy importante en los humanos debido a que es causante de neumonía, pero no representa riesgo para personas sanas. (Massa y Clausen, 2007, 407).

La lipasa PS (anteriormente *Pseudomonas cepacia*) es una enzima globular con una dimensión aproximada de 30x 40 x 50 Å. Se compone de 320 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 33 kDa. La estructura de rayos X de la lipasa indica que su sitio activo se puede dividir en tres dominios. Estos dominios son hidrofóbicos de bolsillo (en las que se les une un grupo acilo), el dominio de tamaño mediano y el bolsillo hidrofóbico suplente (es donde la parte alcohólica sufre los ataques), respectivamente. Lipasa PS actúa como un biocatalizador excelente para la resolución de compuestos racémicos como las aminas y alcoholes. (Ning Li y Quan-Ming, 2009, pp. 267-270).

La característica de la mayoría de las lipasas es la activación interfacial en la interfase lípido o en solventes no polares. La activación interfacial está vinculada a un gran cambio conformacional de una tapa, a partir de una conformación cerrada a una abierta que hace accesible el sitio activo de sustratos. Existen varios mecanismos de la activación interfacial de lipasas que hasta la fecha sólo son suposiciones, con lo cual existen posibles cuellos de botella que no se han encontrado para la lipasa PS aunque se ha demostrado que es una enzima útil para que catalice una amplia gama de reacciones diferentes en agua y solventes no polares en condiciones suaves. Es por esto que la lipasa PS es un catalizador altamente selectivo para una amplia gama de sustratos, incluida la mezcla de alcoholes secundarios de la hidrólisis en

agua o esterificación en disolventes orgánicos con atractivo industrial debido a la preocupación medioambiental.

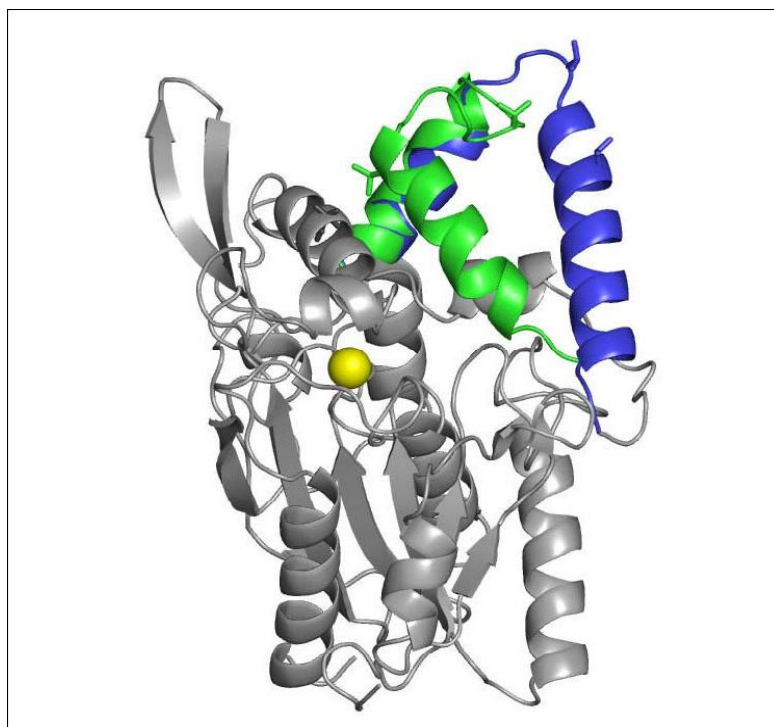


Figura 3.1. Estructura de lipasa PS.

La tapa consiste en una hélice-lazo-hélice con hélice α 4 (residuos 118-127) y α 5 hélice (residuos 134-150), que están vinculados a hélice α 6 (residuos 160-166).

Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

La lipasa B de Candida antarctica (CAL-B) es un catalizador muy eficaz que convierte aminas y alcoholes en amidas y ésteres para ello se conocen diferentes procedimientos enzimáticos para su utilización. El manejo y sencillez del uso de esta lipasa es debido a su disponibilidad comercial, la posibilidad de reciclaje es por eso que es una herramienta ideal en síntesis. (Lucie Couturier y Delphine Taupin, 2009, pp. 29-33).

CAL-B está constituida por 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33 kDa y un $pI=6.0$. Se sabe que CALB cuenta con amplio rango de pH y termoestabilidad. La estructura de rayos X de CAL-B fue identificada en 1994

y; contiene siete láminas β rodeadas por 10 α -hélices; con una dimensión de 30 x 40 x 50 Å. La secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly; existente en la mayoría de las lipasas; no aparece en esta enzima. En su lugar aparece la secuencia Treonina-W-Serina-Q-Glicina. La triada catalítica está compuesta por serina 105, aspártico 187 e histidina 224. La serina se encuentra rodeada por la treonina 40, la glutamina 157 y el ácido aspártico 134, aminoácidos unidos por enlace de hidrógeno y cuyos átomos polares se sitúan a 5 Å del O⁻. Estos residuos están expuestos al disolvente y pueden tener una función importante en la especificidad de sustrato. (Vicente y Eduardo, 2006, pp. 797-812).

El entorno del centro activo está formado por una cavidad de 12 Å de profundidad desde el O de la serina hasta la superficie de la proteína, y una anchura de 10 x 4 Å. Esta cavidad está delimitada por tres regiones de la proteína: la espiral comprendida entre los aminoácidos 242 y 268; la hélice α_{10} (del residuo 268 al 287, cerca del extremo C-terminal) y la hélice α_5 . Esta última α -hélice es de pequeño tamaño (entre los residuos 142 y 146) y posee gran movilidad, por lo que pudiera desempeñar la función de “tapadera”. La entrada a la cavidad del centro activo se sitúa en el centro de una gran superficie plana de 450 Å², con forma triangular y ligeramente cóncava. En esta superficie hay muchas cadenas alifáticas de aminoácidos que pueden interactuar con la interface durante la hidrólisis de lípidos así como tres residuos cargados (aspártico 223, glutámico 188 y lisina 290) cercanos a la entrada de la cavidad.

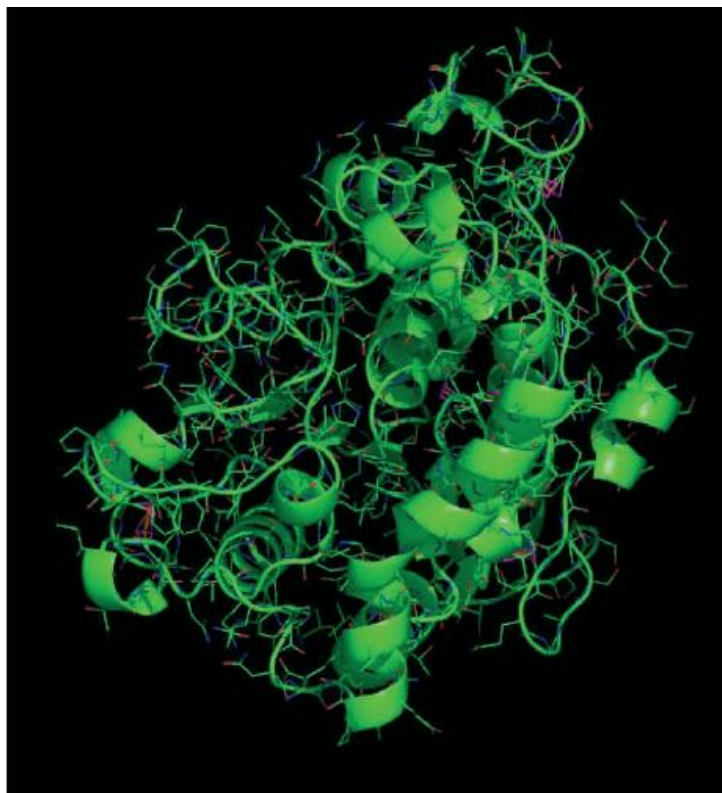


Figura. 3.2 Estructura de CALB.

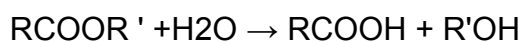
3.7 Reacciones catalizadas por acción de las lipasas

Las lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles de cadena larga en presencia de un exceso de agua y actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol.

La mayoría de las lipasas poseen características importantes, como su estabilidad en solventes orgánicos; y gran versatilidad para realizar diferentes reacciones.

Existen dos categorías principales de las lipasas en las que las en que las reacciones pueden ser catalizadas y son:

I. Hidrólisis:

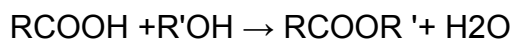




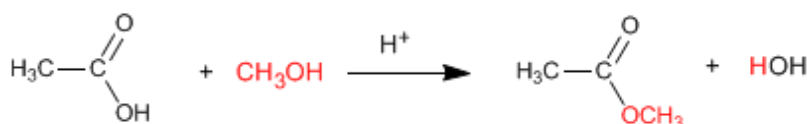
II. Síntesis:

Reacciones dentro de esta categoría pueden ser clasificadas:

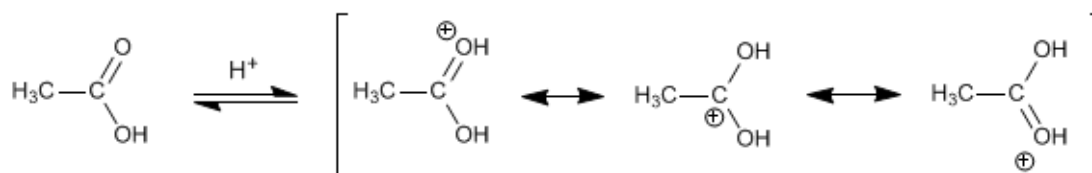
(a) Esterificación



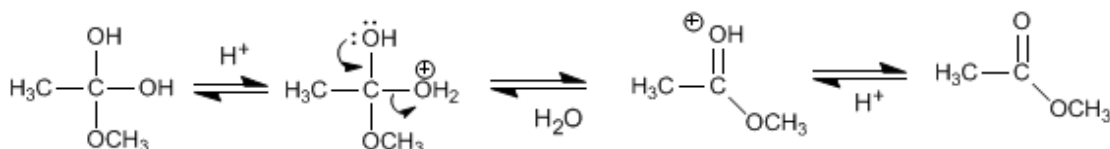
Los ésteres se obtienen por reacción de ácidos carboxílicos y alcoholes en presencia de ácidos minerales. La reacción se realiza en exceso de alcohol para desplazar los equilibrios a la derecha. La presencia de agua es perjudicial puesto que hidroliza el éster formado.



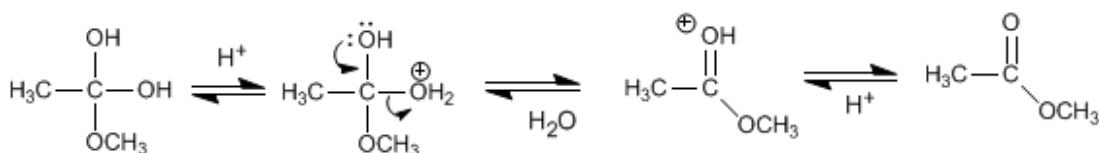
Protonación del grupo carboxilo



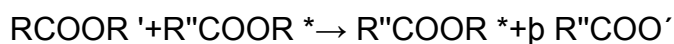
Ataque nucleófilo del metanol al carbono del grupo carboxilo (Adición)



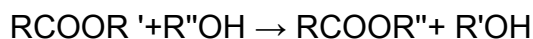
Eliminación de agua



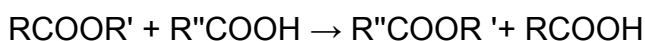
(b) Transesterificación



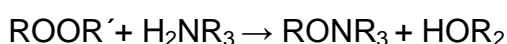
(c) Alcohólisis



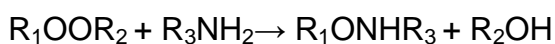
(d) Acidólisis



(e) Amidación



(f) Aminólisis



(Reis y Holmberg, 2009, p. 237-250).

3.8 Condiciones de reacción de síntesis en medio no acuoso catalizada por lipasas.

El potencial de la catálisis enzimática como una herramienta para la síntesis en la biotecnología es hoy indiscutible, como es el hecho de que los solventes orgánicos afectan la actividad de una enzima, la selectividad y la estabilidad. (Vibha Bansal y Yamixa Delgado, 2010, pp. 38-44).

El agua es el medio donde las enzimas actúan normalmente durante los procesos biológicos. Es la cantidad de agua el factor limitante en las velocidades de catálisis sobre todo en las reacciones de esterificación.

La cantidad de agua en la mezcla de reacción puede determinar la dirección de la reacción catalizada por lipasas. Por lo que en cantidades bajas se favorece la transesterificación y la esterificación.

La cantidad de agua contenida en los reactivos y el propio biocatalizador tiene gran influencia en la velocidad de la reacción y en la conversión del producto en las reacciones llevadas a cabo en disolventes orgánicos.

Las enzimas requieren una pequeña cantidad de agua para mantener su estructura, la flexibilidad y por tanto, su actividad catalítica. Se ha calculado

que el contenido de humedad en reacciones catalizadas por enzimas en disolventes no polares deberá oscilar entre el 0,05% al 1%. (Antonio Martínez y Hugo Sergio García, 2008, pp. 393-401).

Para lograr el objetivo, llegar a la esterificación y que la cantidad de agua sea nula se utilizan y adicionan al medio de reacción agentes desecantes (mallas moleculares). Existen algunas estrategias para mantener una baja actividad de agua y estas se muestran en la tabla N° 3.2

Tabla 3.2 Métodos para mantener una baja actividad de agua. (Ruiz, 2007,p. 7)

METODO	PRINCIPIO	REFERENCIA
Tamiz molecular	Absorber el agua presente en el sistema	Kuan, 1998
Preevaporación	Remoción de agua por adsorción o permeación selectiva a una membrana	Kwon, 1995
Presiones reducidas	Remoción del agua de sistema	Linfield, 1984
Soluciones saturadas con sales	Equilibrio de un sistema a una cantidad de agua determinada.	Halling, 1992 Yang, 1993

3.9 Propiedades del éster (Acetato de 1-metoxi 2-propanol)

Nombres

- Acetato de propilen Glicol Metil Eter
- CAS No. 108-65-6
- PMA or PGMEA

3.9.1 Descripción del producto.

Es un líquido incoloro con un olor similar al éter PMA es un disolvente de resinas y tintas que no son compatibles con agua. PMA se utiliza con acrílicos, resinas epóxicas, resinas alquídicas, poliésteres, y otros tipos de resinas.

3.9.2 Usos del PMA a nivel industrial

- Pinturas y recubrimientos Automotriz
- Recubrimientos arquitectónicos
- Metal-Coil Coatings
- Recubrimientos de mantenimiento industrial
- Fabricación de productos electrónicos
de seda, las tintas de impresión de pantalla
Acabado de metales.
- PMA también se formula en productos para el hogar, tales como
productos de limpieza, pinturas (incluyendo la pintura de aerosol), lacas
y barnices, Plaguicidas.

Tabla. 3.4 Propiedades físicas y químicas

Puntos	Protocolo	Resultados
Peso molecular		132.96g/mol
Punto de fusión	JIS K 0065-1966 (Japón)	< - 10 °C (263 K)
Punto de ebullición	ASTM D86	145.8 °C (1,013 hPa)
Presión de vapor	Twin Ebulliometry (Ecuación de Antoine)	3.7 hPa (2.8 Torr) (20 °C)
Punto de inflamación	DIN 51 755	45 °C
Auto inflamabilidad	DIN 51 794	315 °C
Coefficiente de partición	OECD TG 107	0.36 (25 °C)
Solubilidad en agua	OECD TG 105	> 100 g/L (25 °C)

3.9.3 Producción de PMA.

Los éteres de glicol de propileno se fabrican en sistemas cerrados y continuos, la primera reacción producida por el óxido de propileno con metanol mediante un catalizador. PMA se produce en el sistema de cierre total en Japón y se utiliza en la industrial en recubrimientos, removedores de tinta, etc. El volumen de producción del PMA en Japón aproximadamente 15, 000 toneladas / año (Daicel, 1999), mientras que la producción mundial estimada es de 100.000 - 500.000 toneladas / año según IUCLID 1999. PMA se produjo en el año 366 productos químicos en el mercado estadounidense de acuerdo a MSDS-OHS (MDL, 2000). (Ficha de seguridad, 2008, p. 2)

El esquema de la secuencia de la reacción de PM con ácido acético se muestra a continuación Figura 3.3.

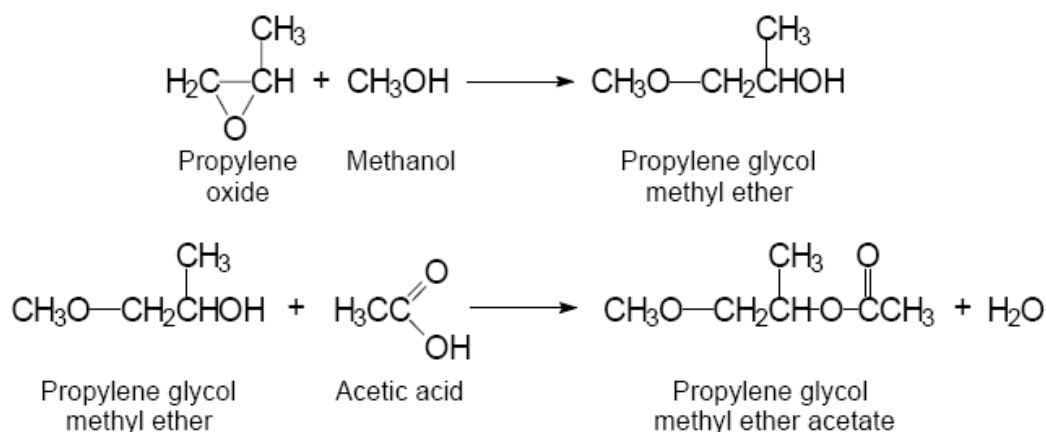


Figura 3.3. Esquema de la reacción catalizada para la producción del PMA.

Capítulo 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y Métodos

4.1.1 Reactivos

1-metoxi-2-propanol (C₄H₁₀O₂) (Sigma-Aldrich-Grado reactivo). Punto de ebullición 119 °C

Soluble en Hexano

Peso molecular 90g/mol. Densidad 0.922g/mL

Ácido acético (C₂H₄O₂) (JT BAKER-Grado reactivo). Punto de ebullición 117 °C. Soluble en hexano.

Peso molecular 60g/mol. Densidad 1.049g/mL

Acetato 1-metoxi-2-propanol (C₆H₁₂O₃) (CAS ·108-65-6) (Sigma Aldrich-Grado reactivo).

Punto de ebullición 146 °C. Soluble en ciclohexano

Peso molecular 132.16 g/mol. Densidad 0.970g/mL

Ciclohexano (C₆H₁₂) (JT Baker, Grado puro. 99.5%)

Punto de ebullición 80.7 °C

Peso molecular 84.2 g/ mol. Densidad 0.779g/mL (liquido)

Metanol (JT Baker, Grado reactivo. 99.5%)

Punto de ebullición 67.4 °C

Peso molecular 32.04 g/mol. Densidad 0.79 g/mL (liquido)

Agua desionizada

Tamiz molecular (Sigma –Aldrich) Dimensiones esféricas de 2 mm y tamaño de poro de 3 Amstrongs. Activado en horno a 120°C por un mínimo de 12 h antes de ser usado.

4.1.2 Biocatalizadores

Lipasa de *Burkholderia cepacia* en su forma libre y liofilizada producida por Amano Chemicals (Japón) y distribuida en México por Sigma Aldrich Química.

Lipasa B de *Candida antarctica* producida por Novo Nordisk (Dinamarca) y inmovilizada (aproximadamente 10 % en peso de enzima respecto al biocatalizador) en una resina macroporosa esférica (1 mm) de Lewatit VP OC-1600 (Lanxess, Alemania) y suministrada en México bajo el nombre comercial Novozym 435.

4.1.3 Equipos

- Agitador incubador Innova 4330, refrigerated incubator shaker, New brunswick scientific.
- Matraces Erlenmeyer de 25 mL con tapón de rosca.
- El análisis del producto se llevó a cabo en un equipo HPLC marca HP 1100. El Sistema HPLC consiste en una bomba cuaternaria, un detector de UV-visible con arreglo de diodos y equipado con auto-muestreador y termostato para columnas. La columna empleada fue una X-terra 18 de Waters (USA).
- Espectrofotómetro UV/VIS modelo lambda 25 (Perkin Elmer).

4.2 Metodología

El procedimiento experimental se llevó a cabo en 3 etapas, debido a que la primera etapa fue considerada como etapa previa, que darían pauta a alcanzar las condiciones necesarias para llevar a cabo las reacciones. A continuación se explica en qué consistió cada etapa.

1. La primera etapa experimental, tuvo como objetivo, desarrollar un método para la cuantificación de acetato 1-metoxi-2-propanol por HPLC.

2. La segunda etapa experimental consistió en determinar las condiciones óptimas de la reacción de esterificación catalizada por la lipasa PS y Novozym 435.
3. La tercera etapa experimental consistió en la evaluación de costos en relación a la producción de PMA y seleccionar la lipasa que eficazmente lleve a cabo la reacción a nivel industrial

4.3 Primera etapa experimental. Desarrollo de la metodología analítica HPLC para la cuantificación de PMA.

Esta etapa experimental de la investigación consistió en desarrollar una metodología para la cuantificación de acetato de 1-metoxi-2-propanol producido en las reacciones enzimáticas.

Como primer paso se realizaron lecturas empleando un espectrofotómetro para determinar en cada caso la longitud de onda en la que absorbe el sustrato y el cromóforo del ácido acético y el producto de reacción. En la Tabla 4.1 se muestran las longitudes de onda máxima de cada uno de los reactivos.

Tabla 4.1 Longitud de onda máxima a la que absorben los reactivos.

Acetato de 1-metoxi-2-propanol.	255nm
Acido acético	260nm

Una vez conocidas las longitudes de onda respectivas, se manejaron estos intervalos como prueba para poder identificar el pico con mejor resolución. Para la separación cromatográfica se empleó una columna C18 (Waters) fase reversa y la detección se realizó tomando en cuenta las características fisicoquímicas de los reactivos y su solubilidad en disolventes comunes en HPLC. Inicialmente se decidió ensayar con una fase móvil conformada por



metanol-agua en proporción 50:50 (v:v) de acuerdo a lo anterior se propuso siguiente sistema:

Columna: waters X- terra (RP₁₈ 5 μ m; 4.6X150mm)

Detector: UV-visible a 254nm

Flujo: 0.8 mL/min

Concentración de los analitos: ácido acético 1mol/L y acetato de 1-metoxi-2-propanol 1mol/L. Los resultados obtenidos en esta longitud de onda están en la figura 4.1

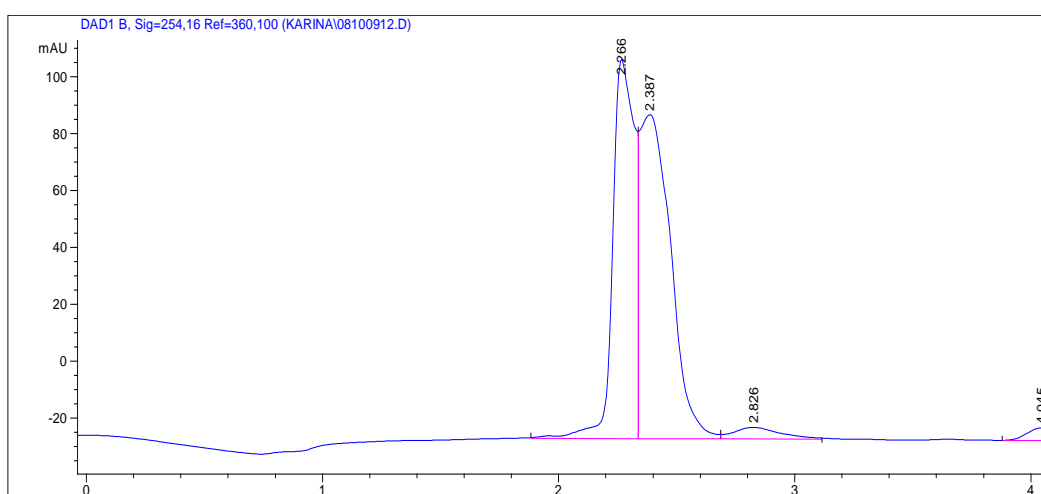


Figura 4.1 Mezcla de los reactivos a la longitud de onda de 254nm usando mezcla 1:1 de metanol:agua (v:v)

En la figura 4.1 el pico que aparece corresponde al ácido acético, y no precisamente con una buena resolución, a si que se continuó con la búsqueda del pico del producto de reacción PMA, que es el de interés. Se prosiguió variando la longitud de onda a 260nm, bajo las mismas condiciones del estudio anterior y los resultados se muestran en la figura 4.2.

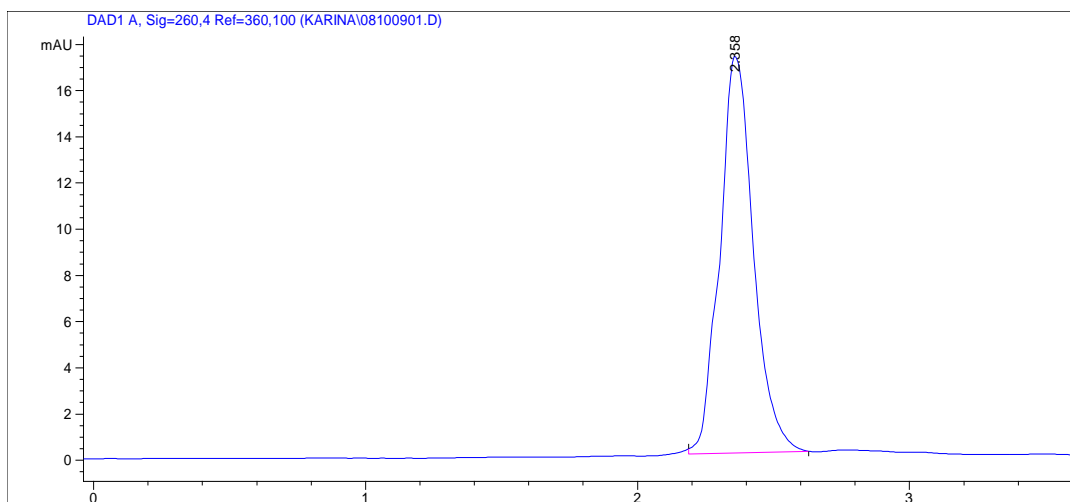


Figura 4.2 Mezcla de los reactivos a la longitud de onda de 260nm mezcla MeOH:H₂O (1:1)

Los resultados obtenidos en esta figura también sólo mostraron la señal del ácido acético, por lo que se continuó con el estudio a diferentes longitudes de onda, hasta llegar a los resultados obtenidos que se muestran en la figura 4.3.

Con los parámetros anteriores también se ensayaron las diferentes fases móviles indicadas en la tabla 4.2, para optimizar los resultados en HPLC.

Tabla 4.2 Fases móviles estudiadas para la cuantificación de PMA.

	Fase móvil	Composición
1	Acetonitrilo: Metanol	97:3
2	Acetato de Etilo: Metanol	3:97
3	Metanol: Agua	70:30
4	Metanol: Agua	60:40
5	Metanol: Agua	50:50
6	Agua: Metanol	75:25

De acuerdo a los resultados obtenidos la fase móvil más promisoría que permitía una mejor interacción con la fase estacionaria y la mejor separación fue la compuesta por Agua- Metanol (75:25).

4.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El método de análisis optimizado mediante HPLC consistió en el uso de una columna waters X-terra (RP₁₈ 5 μ m; 4.6X150mm) en un termostato (30 °C) con un flujo de 0.8 mL/min y una fase móvil constituida por agua:metanol (75:25, v:v). Como detector se usó un UV-visible con arreglo de diodos a $\lambda = 230\text{nm}$.

De acuerdo a las condiciones antes mencionadas se logró determinar que el tiempo de retención del ácido acético es de 2.6 min y del acetato 1-metoxi-2-propanol es de 5.1 min, los resultados se muestran en la figura 4.3 este método es rápido, sencillo, y eficiente.

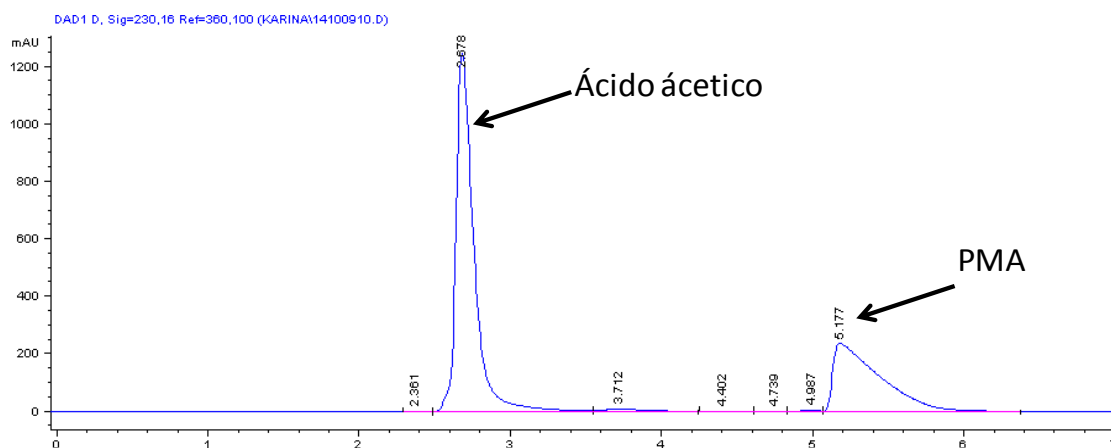


Figura 4.3 Cromatograma de HPLC de una muestra de la reacción.

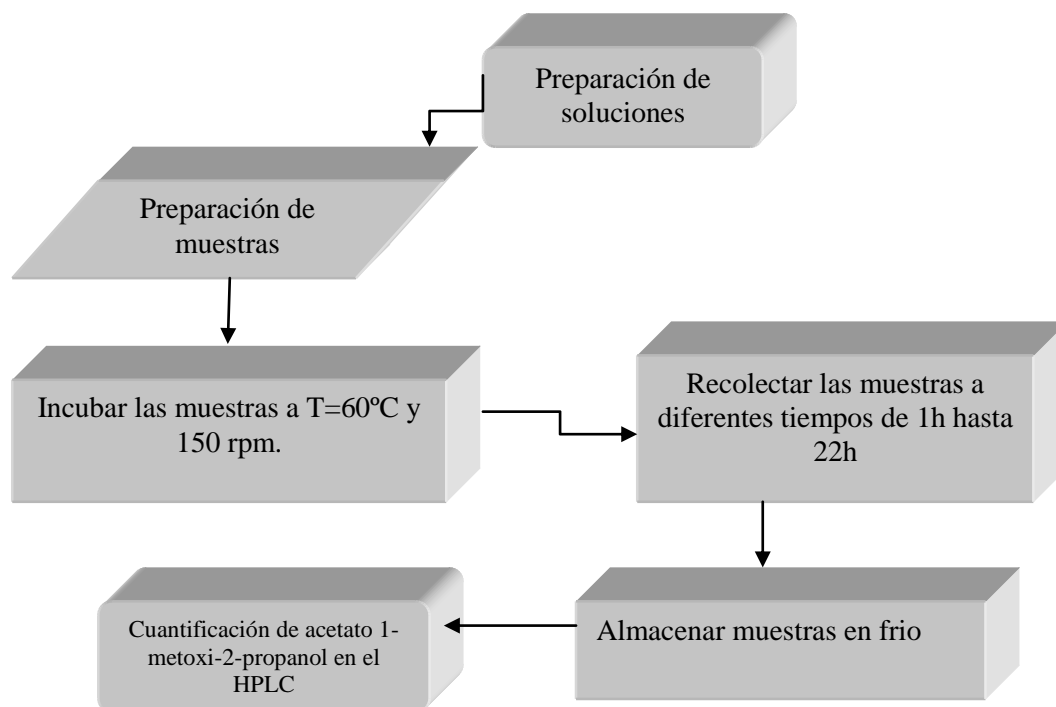
4.4 Preparación de muestras

- 1.-Tomar una alícuota del medio de reacción aproximadamente 1mL.
- 2.- Evaporar el ciclohexano del medio de reacción con la compresora.
- 3.- Aforar a un volumen de 1mL, con una mezcla de 50% Agua y 50% metanol.
- 4.- Filtrar la muestra.
- 5.- Correr muestras en HPLC para el análisis cuantitativo.

4.5 Reacciones de esterificación utilizando el disolvente ciclohexano.

Se mezclaron concentraciones conocidas de los sustratos (ácido acético y 1-metoxi-2-propanol) en relaciones 1:1, fueron diluidos en volúmenes conocidos de ciclohexano y se agregó una concentración conocida del biocatalizador, el agua como subproducto de la reacción fue removida *in situ* del sistema utilizando tamiz molecular activado en exceso todo esto a volúmenes de 25mL en matraces de laboratorio. Las diferentes soluciones fueron colocadas en un agitador-incubador a temperatura controlada de operación llevándose a cabo el estudio cinético y rendimiento del producto. El análisis cuantitativo del rendimiento se realizó mediante HPLC.

4.6 ESQUEMA EXPERIMENTAL



Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Para la cuantificación del producto se elaboró una recta de calibración o patrón donde se utilizaron diferentes concentraciones del producto puro.

En la Tabla 5.1 se presentan las áreas correspondientes a las soluciones de PMA empleadas para la elaboración de la recta patrón.

Tabla 5.1 Concentración de las soluciones de PMA y el área correspondiente

acetato 1-metoxi-2-propanol (mol/L)	Área
0.1	960.113
0.2	1964.35
0.3	2987.92
0.4	4064.21
0.5	4704.02

En la **Figura 5.1** se presenta en forma ilustrativa la curva patrón de PMA, además se añade la ecuación de regresión lineal.

La ecuación de regresión final:

$$Y=12459x-41.639$$

Se empleó para sustituir las áreas correspondientes al producto de reacción y, por correlación, conocer la concentración de PMA en cada cromatograma.

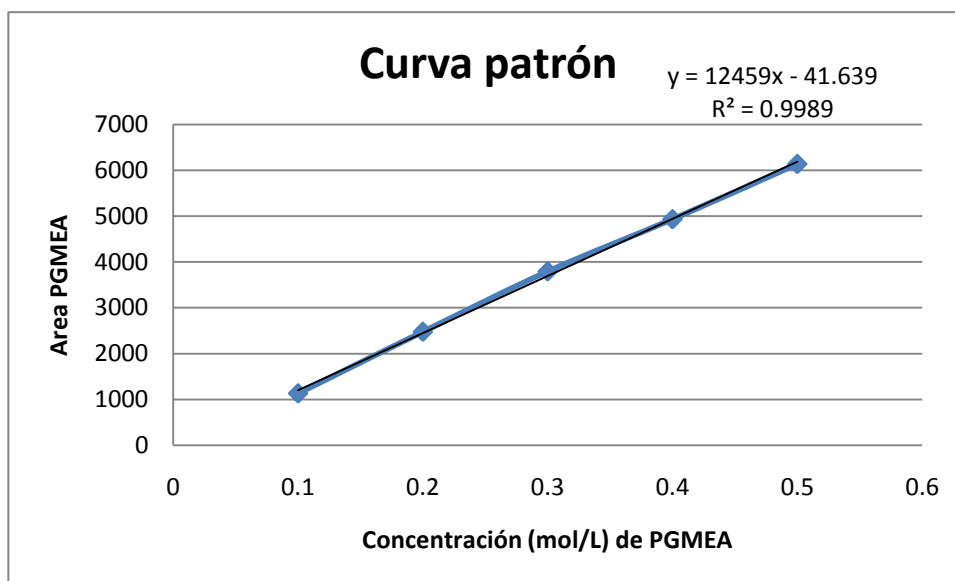


Figura 5.1 Curva patrón del producto de reacción (acetato de 1-metoxi-2-propanol)

Se establecieron las curvas de calibración en el rango 0.1-0.5 mol/L. El coeficiente de correlación fue de 0.998.

5.1 Efecto de la temperatura en la síntesis de esterificación con lipasa PS.

El tiempo considerado para la reacción, se realizó en el intervalo de 1 a 22 h esto con el fin de investigar el efecto de la temperatura y conocer las condiciones óptimas de la lipasa de PS libre en la síntesis de esterificación.

A continuación en la tabla 5.2 se muestra la cantidad de cada uno de los componentes del medio de reacción.

Tabla 5.2 Composición para síntesis enzimática de acetato PMA

Componente	Cantidad
Acido acético	0.5 mol/L
Glicol éter	0.5 mol/L
Disolvente (ciclohexano)	23.065 mL
Enzima (<i>Lipasa PS</i>)	5g
Tamiz molecular	5g

Para determinar cuál de ellas presenta una mayor actividad catalítica, se establecieron como temperaturas óptimas de reacción 40, 50 ,60 °C, debido a que casi todas las lipasas tienen actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura; entre 30 y 70 °C y a una agitación constante de 150 rpm.

La Tabla 5.3 presenta el rendimiento del producto de reacción con las tres temperaturas en estudio.

Tabla 5.3 Rendimiento de PMA con efecto de la temperatura

Temperatura de (°C)	Rendimiento PMA (%)
40	-
50	5.29
60	29.75

En la figura 5.2 se hacen notar los resultados del rendimiento de PMA

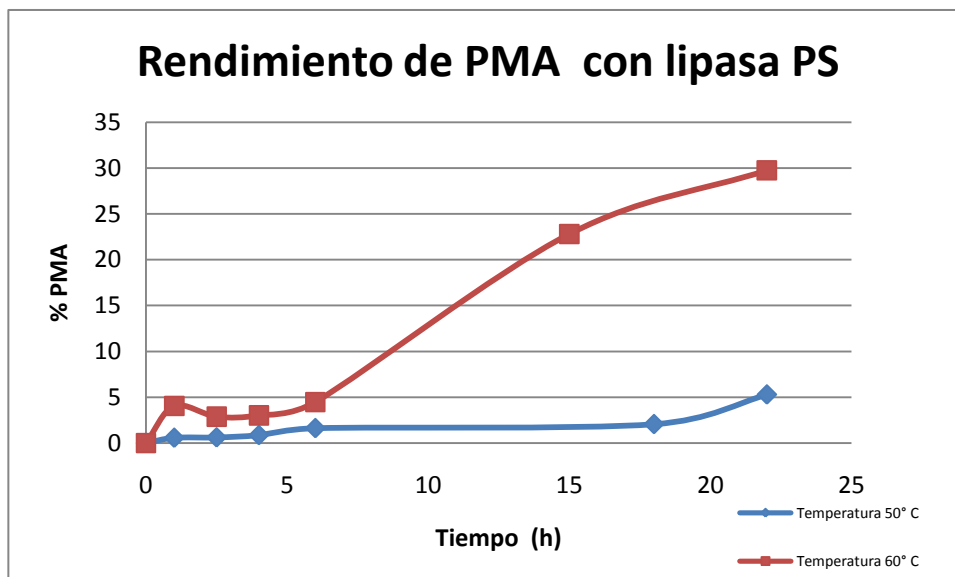


Figura. 5.2 Rendimiento de PMA en función de la temperatura con lipasa PS

Los resultados obtenidos muestran que a la temperatura de 40°C, no se efectuó la reacción de esterificación, esto pudiera ser que no es la temperatura óptima de reacción de la lipasa; a la temperatura de 50° C se obtuvo un rendimiento de 5.29%, en 22 h; sin embargo como el objetivo es alcanzar el máximo rendimiento se prosiguió con el aumento de temperatura a 60° C y los resultados arrojan que a las 22 h de reacción, el rendimiento de PMA es mayor de casi el 30%, con los resultados observados se encontró que la velocidad de reacción aumenta con el aumento de temperatura.

De esta manera, la temperatura de 60°C; fue elegida como una temperatura óptima para reacciones posteriores, evitando la desnaturalización de la enzima por efecto de la temperatura.

5.2 Síntesis de PMA con CAL-B

Para llevar a cabo la reacción de esterificación con la Novozym 435 se tomaron como referencia las condiciones de reacción de las lipasas, las condiciones empleadas de síntesis son, una relación equimolar de los sustratos de 0.5 mol/L, con 1g del biocatalizador y agitación constante de 150 rpm a una temperatura de 60 °C.

En la figura 5.3 se observan los resultados obtenidos con la CALB.

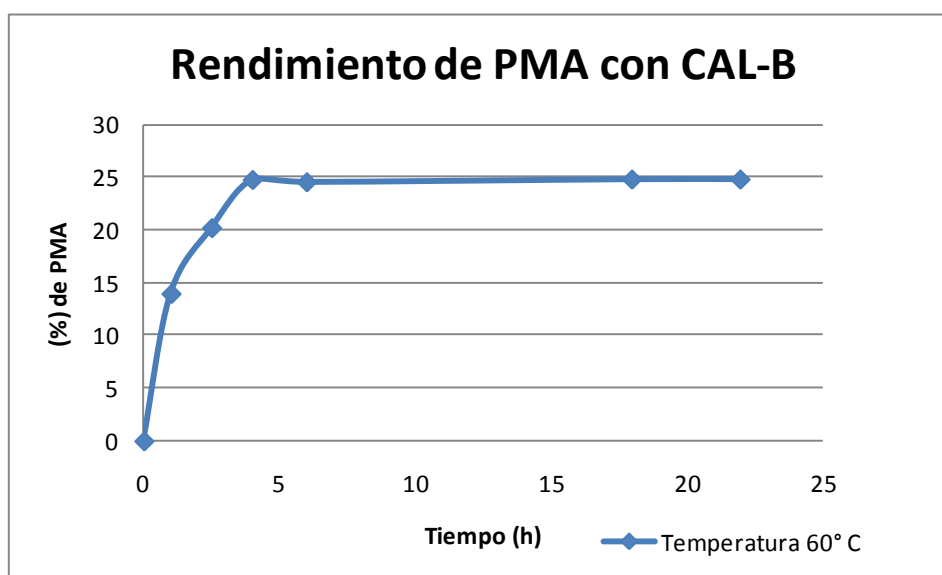


Figura 5.3 Rendimiento de PMA en función de la temperatura con CAL-B

En la figura 5.3 se observa que a estas condiciones de reacción no se obtuvieron rendimientos altos, por lo que se procedió con la búsqueda de parámetros para la optimización de la lipasa que favorecerá la formación del producto PMA.

5.3 Efecto de la concentración de lipasa PS

Tanto la Lipasa PS como CALB son termoestables, estas se pueden aplicar en los procesos de esterificación en disolventes orgánicos donde la termocinética de la reacción se ve favorecida al aumentar la temperatura. Por otro lado, se sabe que la concentración de la enzima es una de las variables que afecta la velocidad de reacción. En el presente estudio, se utilizaron 2, 5, y 10 g del biocatalizador, para evaluar las condiciones de esterificación.

Las condiciones empleadas para esta cinética de reacción son: 0.5 mol/L de 1-metoxi-2-propanol, 0.5 mol/L de ácido acético, 5 g de tamiz molecular, con agitación constante de 150 rpm a una temperatura de 60°C. La Tabla 5.4 presenta el rendimiento del producto de reacción con las variaciones de concentración del biocatalizador Novozym 435.

Debido a las observaciones de la figura 5.2 respecto al tiempo de reacción se amplió el intervalo de tiempo hasta las 26 h para observar cual es el máximo rendimiento.

Tabla 5.4 Variaciones de concentración del biocatalizador en estudio.

Concentración de enzima (g)	Rendimiento (%)
2	--
5	40.08
10	44.78

En la figura 5.4 se hacen notar los resultados del rendimiento de PMA con la concentración de lipasa PS.

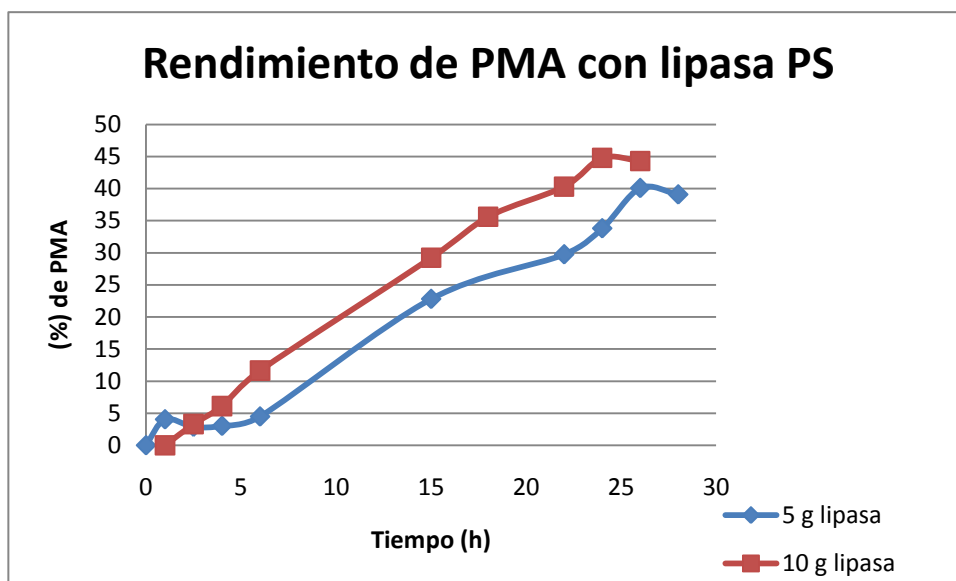


Figura 5.4 Rendimiento del producto de reacción con las variaciones de concentración de la lipasa PS.

Los resultados mostraron que con la cantidad de 2g de lipasa PS no se llevó a cabo la reacción de esterificación, y el rendimiento a las 26 h es muy bajo, por lo que se decidió agregar una mayor cantidad de lipasa, al agregar la cantidad de 5 g de lipasa el rendimiento alcanzado a las 26 h es de 40.08%, con los resultados obtenidos se observó que al aumentar la concentración de lipasa se aumentaba el rendimiento de la reacción, debido a esto se consideró agregar el doble de lipasa y lograr el objetivo planteado, alcanzar el rendimiento más alto del producto PMA, al agregar 10g de lipasa en la reacción, se observó que no mejoró el rendimiento, esto porque todo el sustrato disponible se está formando en el complejo enzima / sustrato y sus (Sitios activos) de la enzima ya están ocupados, por tanto la lipasa que se encuentra en mayor proporción no está reaccionando y el rendimiento es muy similar que al agregar 5 g de la enzima.

5.4 Efecto de la concentración de la lipasa con CAL-B

Las condiciones empleadas en este estudio son; una relación de concentración equimolar de 1-metoxi-2-propanol y de ácido acético a 0.5 mol/L, 5 g de tamiz molecular, a 150 rpm con una temperatura de 60°C.

Se realizaron estas reacciones con el fin de mejorar el rendimiento de la reacción, esto porque en el estudio anterior se había trabajado con 1g de lipasa y los resultados no fueron los mejores así que se decidió incrementar la cantidad de lipasa en esta reacción, utilizando 2g de Novozym 435 y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.5

Tabla 5.5 Rendimiento de PMA con efecto de la concentración de la enzima

Concentración de enzima (g)	Rendimiento (%)
1	24.76
2	42.2

En la figura 5.5 se hacen notar los resultados del rendimiento de PMA con la concentración de lipasa de CAL-B.

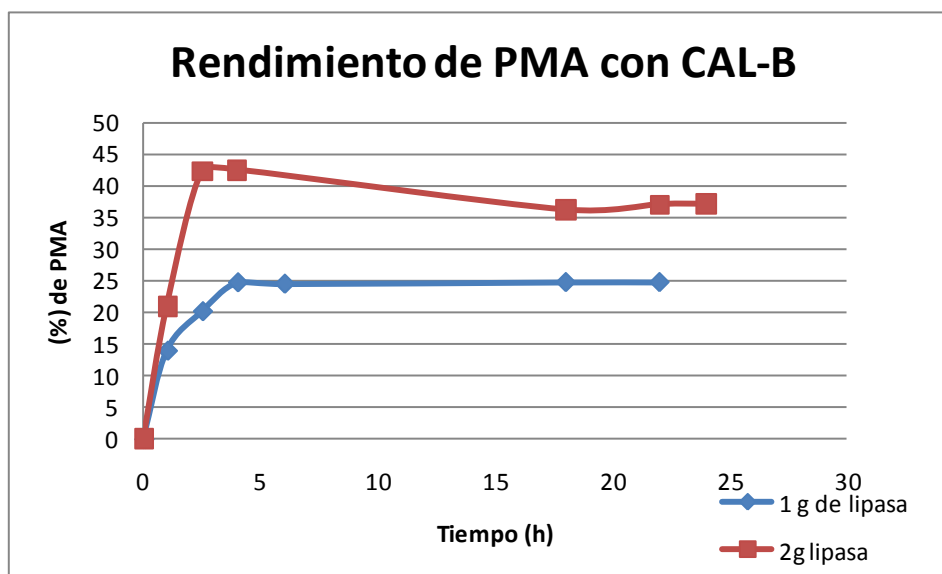


Figura 5.5 presenta el rendimiento del producto de reacción con las variaciones de concentración de CAL-B.

Al observar la figura 4.8 se identificó que se tiene un mayor rendimiento con la cantidad de 2 g del biocatalizador, esto debido a que la concentración de lipasa influye en la velocidad de reacción, como pasó en el estudio anterior utilizando la lipasa de *PS*.

5.5 Efecto de la concentración de sustrato en reacciones empleando la Lipasa PS.

Las lipasas son activas hacia una gran variedad de ésteres y lo que influye es el tipo de alcohol y ácido. Como ejemplo las lipasas no específicas (CAL B/A) que catalizan la reacción de esterificación tanto con alcoholes primarios como con secundarios, a diferencia de las lipasas específicas (*Rhizomucor miehe*) que lo hacen preferentemente con alcoholes primarios.

Lo que se hace en un estudio cinético para determinar una posible inhibición en la actividad enzimática, que puede ser causada por cualquiera de los sustratos, es determinar el grado de inhibición. Las posibles inhibiciones de actividad enzimática dependen del tipo particular de enzima, (fuente de la enzima, la inmovilización, especificidad, entre otras), también influye el medio de reacción y las condiciones de funcionamiento, principalmente la temperatura y pH. Sin embargo, se ha encontrado una inhibición significativa causada por los alcoholes en diferentes lipasas (Chowdary y col. 2000).

Para optimizar el efecto de la relación equimolar de los sustratos las condiciones a las que se llevaron a cabo las reacciones de esterificación son las siguientes; 5g de lipasa, 5g de tamiz, 150 rpm a una temperatura de 60 °C durante 26 h.

Las relaciones equimolares probadas fueron 0.5mol/L y 0.75mol/L y; los resultados se muestran en la tabla 5.6

Tabla 5.6 Rendimiento de PMA con efecto de la concentración de sustratos.

Concentración mol/L equimolar de los sustratos (ácido acético y 1-metoxi-2-propanol)	Rendimiento (%)
0.5	24.76

En la figura 5.6 se hacen notar los resultados del rendimiento de PMA con la concentración de sustratos.

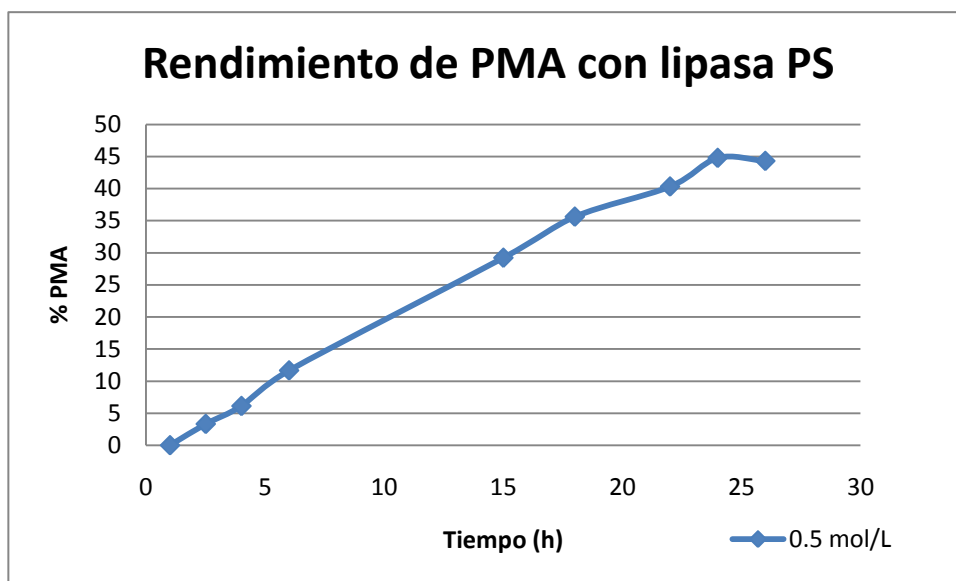


Figura 5.6 Rendimiento de PMA con efecto de la concentración de los sustratos.

Con *Burkholderia cepacia* el rendimiento alcanzado del producto en la relación equimolar de 0.5mol/L fue de 40.08% y en la relación equimolar a 0.75mol/L no se llevó a cabo la reacción.

5.6 Efecto de la concentración de los sustratos para la esterificación con CAL-B

Las condiciones empleadas para el estudio de la reacción son 2g de biocatalizador, 5 g de tamiz molecular, temperatura de 60°C y a 150 rpm, las relaciones equimolares de concentración de los sustratos que se emplearon fueron, 0.5 mol/L y 0.7 mol/L de (ácido acético/1-metoxi-2-propanol), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.7

Tabla 5.7 Rendimiento de PMA con efecto de la concentración de los sustratos.

Concentración equimolar de los sustratos (ácido acético y 1-metoxi-2-propanol)	Rendimiento (%)
0.5	42.2
0.75	30.2

En la figura 5.7 se hacen notar los rendimientos de PMA con efecto de la concentración de los sustratos.

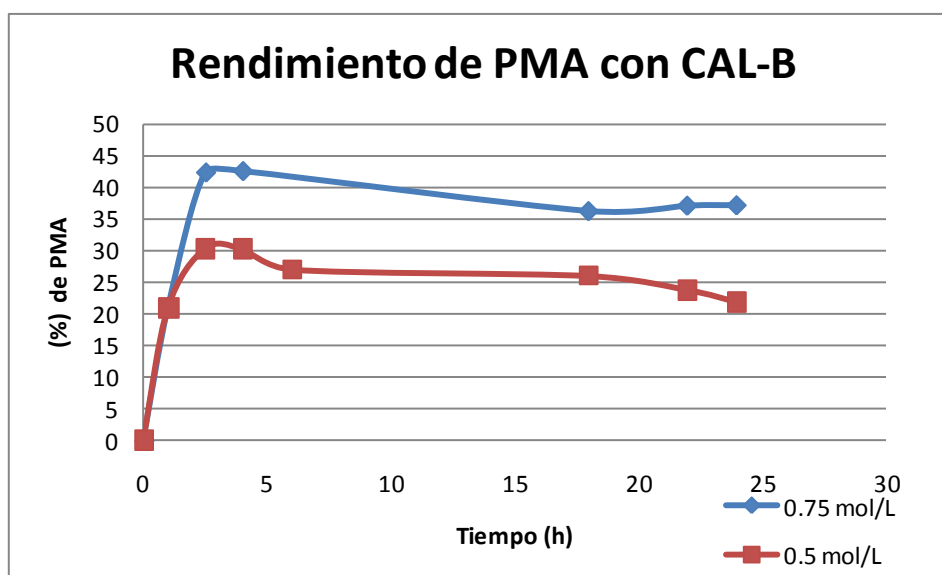


Figura 5.7 Rendimiento de PMA con efecto de la concentración de los sustratos.

Los resultados obtenidos con la Novozym 435 en la relación equimolar de 0.5 mol/L es de 42.2% de PMA a las 4 h de reacción y en la relación equimolar de 0.75 mol/L es de 30.2% a las 4h de reacción. La razón del descenso en el rendimiento en el segundo caso pudiera deberse a la concentración más alta del ácido acético que inhibe la lipasa.

5.7 Influencia de diferentes biocatalizadores

Entre las lipasas probadas, la CALB inmovilizada (Novozym 435); resultó ser el biocatalizador más activo para la acetilación de 1-metoxi-2-propanol; con la utilización de éste se obtuvo el mayor rendimiento del producto de reacción que se alcanzó a las 4 h de reacción con 42.2%, los resultados se muestran en la figura 5.8, cuando la síntesis fue catalizada por la lipasa de *PS* el rendimiento después de 4 horas fue del 3.02% los resultados se muestran en la figura 5.8. La cinética de reacción en el caso de la Novozym 435 es más rápida. Esta diferencia puede ser debida a la especificidad de las enzimas hacia los sustratos.

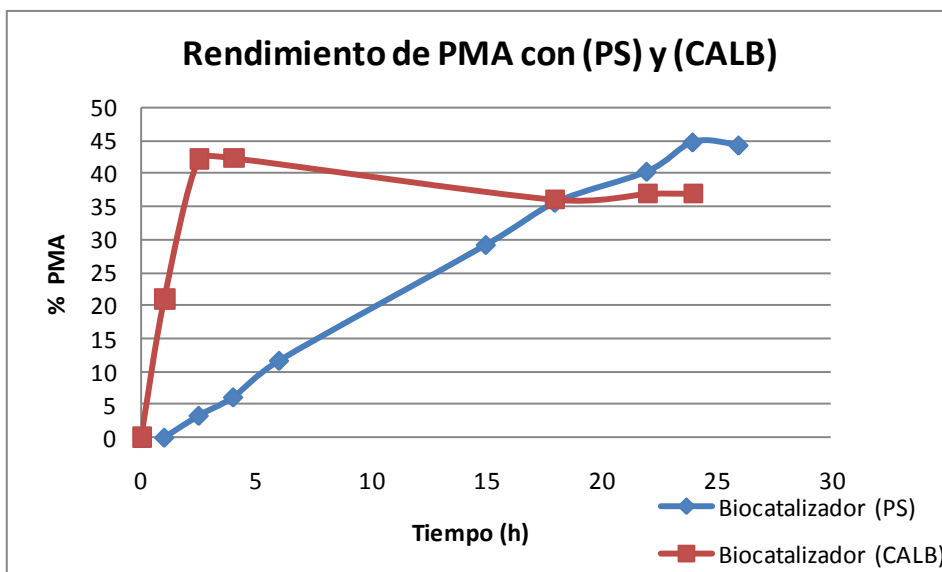


Figura 5.8 Rendimiento de PMA efecto de los dos biocatalizadores en uso (PS) y (CALB)

5.8 Tercera parte experimental

Análisis de costos (Sigma-Aldrich)

Propylene glycol monomethyl ether acetate PGMEA

484431-1L 621.00 MXP

484431-4L 1,660.00

484431-18L 4,597.00

Burkholderia cepacia

534641-10G 651.00

534641-50G 1,670.00

Candida antarctica lipasa B inmovilizada (Novozym 435)

L4777-3G 1,037.00

L4777-10G 2,499.00

Molecular sieves, 3A°

208582-1kG 1,468.00

208582-5kG 4,274.00

1-Methoxy-2-propanol
484407-1L 501.00
484407-4L 1,342.00
484407-18L 4,426.00

Ácido acético Glacial
2.2kg 2,136.00
Ciclohexano
4L 2,889.0 pesos

5.8.1 Costos por cada lipasa

En esta etapa se analizaron los costos de materiales utilizado las dos lipasas y así mencionar cuál de ellas facilitaría los gastos de producción aplicándolos a nivel industrial, los resultados del análisis de la lipasa de *Burkholderia cepacia* se muestran en la tabla 5.8, y los resultados del análisis de la lipasa B de *Candida Antarctica* inmovilizada se muestran en la tabla 5.9

Tabla 5.8 Costos de la Lipasa libre de *Burkholderia cepacia*

Componente	Cantidad	Costos MXP
Ácido acético	0.715 mL	0.694
1-Metoxi-2-Propanol	1.22mL	0.299
Disolvente (ciclohexano)	23.065 mL	16.658
Enzima (<i>Burkholderia cepacia</i>)	5g	167
Tamiz molecular	5g	4.777
Total		189.42

Tabla 5.9 Costos de la lipasa B de *Candida Antarctica* inmovilizada

Componente	Cantidad	Costos MXP
Ácido acético	0.715 mL	0.694
1-Metoxi-2-Propanol	1.22mL	0.299
Disolvente (ciclohexano)	23.065 mL	16.658
Enzima (<i>lipasa B de Candida Antarctica</i>)	2g	691.33
Tamiz molecular	5g	4.777
Total		719.442

Al analizar los costos de los materiales se observó que los costos con la lipasa B de *Candida Antarctica* inmovilizada son más altos que con de la Lipasa de *Burkholderia cepacia*, esto pudiera ser porque *Candida Antarctica* esta soportada y esto eleva su coste.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento para la determinación y cuantificación de acetato de 1-metoxi-2-propanol.

Este trabajo se dedicó a estudiar la posibilidad de sintetizar acetato 1-metoxi-2-propanol mediante la utilización de dos biocatalizadores. Donde la lipasa B de *Candida antarctica inmovilizada (Novozym 435)* es muy eficiente para catalizar la esterificación ya que presenta una mayor velocidad de reacción, su actividad catalítica fue máxima a las condiciones de 2g de biocatalizador, 0.5 mol/L de la relación de concentración de sustratos (ácido acético y 1-metoxi-2-propanol), 5 g de tamiz molecular, con una agitación de 150 rpm a una temperatura de 60°C durante 4h. El coste de materias es mayor en el caso de la Novozym 435 que en el caso de las lipasas PS, sin embargo el tiempo de reacción con la Novozym 435 es mucho menor, lo que disminuiría los costos de producción.



Estos estudios sobre el efecto de las variables de operación sobre el rendimiento del éster y de velocidad de reacción inicial facilitará aún más la optimización económica del proceso antes de aumentar la escala a la producción industrial.

Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Antonio Martínez-Ruiz, Hugo Sergio García “Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation” *Appl Biochem Biotechnol* (2008) 151:393–401.
2. Claudia Massa y Mads H. Clausen “Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia*” *Biochem. J.* (2007)407, 207-217.
3. F. Hollmann, P. Grzebyk, V. Heinrichs, K. Doderer, O. Thum “ On the inactivity of candida antarctica lipase B towards strong acids” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (2009)257-261.
4. Ganapati D. Yadav y Piyush S. Lathi “Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions” *Enzyme and Microbial Technology* 38(2006) 814-820.
5. H.D.Belitz, w. Grosch “Química de los alimentos” Editorial acribia, S.A. Zaragoza. España. (1991) Pp.105.
6. Karsten Bartling, Judith U. S. Thompson“ Lipase-Catalyzed Synthesis of Geranyl Acetate in n-Hexane With Membrane-Mediated Water Removal” *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 75, Issue 6 (2001). (p 676-681).
7. Katia L. Ruizl “ Uso de la lipase de *Bacillus pumilus* GMA1 en biocatálisis”. (Tesis licenciatura, UNAM, México,2007, 7.

8. Kenthorai Raman Jegannathan, Eng-Seng Chan, Pogaku Ravindra,” Physical and stability characteristics of Burkholderia cepacia lipase encapsulated in K- carrageenan” Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic 58 (2009) 78-83.
9. Lucie Couturier, Delphine Taupin” Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids” journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 56(2009) 29-33.
10. Martha R. Miralles, “Estudio de la regulación por fuente de carbono en la producción de lipasas de cepas de *Rhizopus delemar*” UNAM,(2000),7.
11. Mark Baynham Ph. D., Waters Quality parts, chromatography columns and supplies catalog.(2006 Waters corporation) ,89.
12. Miscibility 1-Methoxy-2-propyl acetate, (en línea, disponible en <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/1-METHOXY-2-PROPYL%20ACETATE.htm>; internet; accesado el 28 septiembre de 2009).
13. Ning Li,Quan-Ming Zeng, Min-Hua Zong “ Substrate specificity of lipase from Burkholderia cepacia in the synthesis of 3`-arylaliphatic acid esters of floxuridine” Journal of biotechnology 142(2009) 267-270.
14. Owen R. Fennema “Química de los alimentos” editorial acribia S.A. Zaragoza. España. (1995) Pp.306-3012.
15. P.Gacesa y J. Hubble “Tecnología de los enzimas” editorial acribia, S.A. Zaragoza. España. (1998) Pp.3-4.
16. P. Reis y K. Holmberg “ Advances in Colloid and Interface Science” Elsevier 147-148 (2009),237-250.

17. Robert Iortie “Enzyme catalyzed Esterification” *Biotechnology Advances*. Vol. 15, No. 1. (1997) pp. 1-15.1.
18. Rodolfo Quintero Ramírez “Ingeniería bioquímica” Departamento de Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México, editorial aLhambra mexicana. (1990) Pp.11-12.
19. Sergio A. Alatorre, “Ensayo de la reacción de esterificación enzimática de los ácidos cinámico- ferúlico y sus dehidro-derivados con ácido láctico” (Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México,(2006),5.
20. Vicente Gotor-Fernández, Eduardo Busto “Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds” *Advanced Synthesis & Catalysis*, Volume 348, Issue 7-8 2006 (p 797-812).
21. Vibha Bansal , Yamixa Delgado, Ezio Fasoli, Amaris Ferrer, Kai Griebenow, Francesco Secundo, Gabriel L. Barletta. “Effect of prolonged exposure to organic solvents on the active site environment of subtilisin Carlsberg” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010)38–44.
22. Wiseman Manual de biotecnología de las enzimas, editorial Acibia, S.A. editorial, Zaragoza. España. (1991) Pp.305-306.
23. Xiongwen Cao y Jiangke Yang”Improving esterification activity of Burkholderia cepacia lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues” *Process Biochemistry* 44 (2009) 177-182.
24. Yu-Yen Linko y Xiaoyan Wu “Biodegradable products by lipase biocatalysis” *journal of Biotechnology* 66 (1998) 41-50.