

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ESTERES DE GERANIOL Y NEROL, USANDO
LIPASA INMOVILIZADA DE *Thermomyces lanuginosus***

**DANIEL FERNANDO DUARTE PABÓN
JESÚS ARMANDO PIRATEQUE LAYTON**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE NEROL Y GERANIOL, USANDO
LIPASA INMOVILIZADA DE *Thermomyces lanuginosus***

**DANIEL FERNANDO DUARTE PABÓN
JESÚS ARMANDO PIRATEQUE LAYTON**

**Trabajo de grado para optar por el título de
Ingeniero Químico**

**Director: Prof. CARLOS JESÚS MUVDI NOVA
Ingeniero Químico, Msc. PhD.**

**Codirectora: Prof. JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, Msc. Doctora en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

A Dios por su gran ayuda en todo momento.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis pasos.

A mis amigos y compañeros por estar conmigo a cada instante.

Jesús Armando Pirategue Layton

A mis padres por todo el apoyo recibido y por su inmensa capacidad de sacrificio.

A mi hermana por acompañarme durante todo este proceso.

A Jaime Z.E.P.D. por su maravillosa personalidad y sus sabios consejos.

Daniel Fernando Duarte Pabón

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	18
ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS	18
1.1. GENERALIDADES	18
1.2. PRODUCCIÓN DE ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS	18
ACTORES QUE PARTICIPAN EN LA REACCIÓN DE FORMACIÓN	
ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS	19
1.3. GENERALIDADES	19
1.4. FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS	20
1.5. ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS	22
1.6. CATALIZADOR: LIPASA DE <i>THERMOMYCES LANUGINOSUS</i>	23
CAPITULO II. METODOLOGÍA	27
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS	27
2.2. PRETRATAMIENTO	28
2.3. ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA	28
2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE REACCIÓN	29
2.5. EXTRACCIÓN	30
2.6. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO	
DE GERANIOL Y NEROL	30
2.7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO	
EXPERIMENTAL	31
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS	32
3.2. PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO EN LAS	
CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	41

3.3. CINÉTICA DE LA REACCIÓN	41
3.4. VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA	42
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco	21
Tabla 2. Variables independientes y niveles de diseño	29
Tabla 3. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto 2^3 + estrella (CCRD) aplicado a la reacción de alcoholisis	33
Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y_1 (Laurato de geraniol formado)	36
Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y_2 (Laurato de nerol formado)	36
Tabla 6. Combinación de factores y niveles que maximizan la formación de laurato de geraniol	40
Tabla 7. Combinación de factores y niveles que maximizan la formación de laurato de nerol	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de la palma de aceite	20
Figura 2. Palma africana de aceite	20
Figura 3. Estructura frecuente en terpenoides	22
Figura 4. Estructura Molecular Nerol y Geraniol	23
Figura 5. Diagrama de bloques de la metodología	27
Figura 6. Comparación de la tendencia de formación de Laurato de Geraniol y Nerol según diseño experimental	34
Figura 7. Diagrama de efectos principales para Y1 (Laurato de geraniol formado)	34
Figura 8. Diagrama de efectos principales para Y2 (Laurato de nerol formado)	35
Figura 9. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta (Laurato de geraniol formado)	37
Figura 10. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta (Laurato de nerol formado)	37
Figura 11. Superficie de respuesta del Laurato de geraniol formado	39
Figura 12. Superficie de respuesta del Laurato de nerol formado	40
Figura 13. Cinética de la reacción de alcoholisis	42
Figura 14. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL IM en las condiciones óptimas finales	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Diseño de experimentos para el diseño central compuesto $2^3 +$ estrella	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- CICTA** Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos
- ANOVA** Analysis of Variance (Análisis de varianza)
- CCRD** Central Composite Rotatable Design (Diseño central compuesto rotatorio)
- CNO** Coconut Oil (Aceite de coco)
- FID** Flame Ionization Detector (Detector de ionización de llama)
- GC** Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
- HPLC** High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
- IFRA** International Fragrance Association (Asociación de fragancias internacional)
- PKO** Palm Kernel Oil (Aceite de palmiste)
- R²** Coeficiente de determinación
- rpm** Revoluciones por minuto
- RSM** Response Surface Methodology (Metodología de superficie de respuesta)
- TAG's** Triacilgliceroles

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ESTERES DE NEROL Y GERANIOL, USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE *Thermomyces lanuginosus*¹

AUTORES: Duarte Pabón, Daniel Fernando. Pirateque Layton, Jesús Armando²

PALABRAS CLAVES: Alcohólisis, aceite de palmiste, ésteres terpénicos, lipasa.

DESCRIPCIÓN:

La alcohólisis es un proceso utilizado en la modificación de aceites vegetales para obtener ésteres alquílicos de ácidos grasos, utilizados directamente o como materia prima para la fabricación de aditivos alimenticios, surfactantes, emulsificantes, sustitutos de grasas, productos cosméticos, agentes aromatizantes y biocombustibles.

En este trabajo se llevó a cabo la reacción de alcohólisis mediante un proceso enzimático empleando como catalizador lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus* y como sustratos aceite de palmiste, y como alcoholes Nerol y Geraniol, con el fin de dar un mayor valor agregado a estos últimos.

Se evaluaron las principales variables que afectan la reacción de alcohólisis, y se determinaron las condiciones con las cuales fue posible obtener el máximo rendimiento de la reacción aplicando un diseño experimental, basado en un diseño central compuesto rotatorio de $2^3 +$ estrella, analizado por metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics centurión XV. Finalmente, se evaluó la variación de la capacidad catalítica de la enzima y la cinética de la reacción.

En las condiciones de reacción seleccionadas (Relación de sustratos 2,8:1 - alcohol:aceite, 10,2% de enzima con respecto al peso del aceite, 250 rpm y 70 °C) permiten alcanzar porcentajes de formación de laurato del 33,9%. Se fijó el tiempo óptimo de reacción en dos horas ya que en este tiempo se alcanza más del 90% de formación total posible. Además se encontró que después de cuatro reusos de la enzima en reacciones sucesivas de alcohólisis bajo las mismas condiciones la disminución en el rendimiento de la reacción es del 39%.

¹ Proyecto de grado

² Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Codirector: Janeth Aidé Perea Villamil

ABSTRACT

TITLE: ENZYMATIC SYNTHESIS OF ESTERS OF NEROL AND GERANIOL, USING IMMOBILIZED LIPASE FROM *Thermomyces lanuginosus*³

AUTHORS: Duarte Pabón, Daniel Fernando. Pirateque Layton, Jesús Armando⁴

KEY WORDS: Alcoholysis, palm kernel oil, terpenic esters, lipase.

DESCRIPTION:

The alcoholysis is a process used in the vegetal oil modification to obtain alkyl esters of greasy acids, used directly or like raw material to the manufacture of food additives, surfactants, emulsificants, cosmetic products, flavouring agents and biofuels.

In this work the alcoholysis reaction by an enzymatic process was carried out using immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* as catalyst and palm kernel oil as substrates, and Nerol and Geraniol as alcohols, in order to provide greater value to the latter.

Main variables that affect the reaction of alcoholysis were evaluated, conditions which allow to achieve maximum yield were determined by applying an experimental design based on a rotator central composite design $2^3 + \text{star}$. It was analyzed by response surface methodology using the statistical software, Statgraphics centurion XV. Finally, the enzyme's catalytic capacity variation and the kinetic of the reaction were evaluated.

In the selected reaction conditions (substrates ratio 2,8:1 – alcohol:oil, 10,2% of the enzyme with respect to the weight of oil, 250 rpm and 70 °C) allow achieve laurate formation rates of 33.9%. Optimum reaction rate was set in two hours because of at that time was reached over 90% of total possible formation. Moreover, the decrease in the yield of the reaction of 39% under the same conditions was found after four reuse of the enzyme in subsequent reactions of alcoholysis.

³ Degree work

⁴ Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Advisor: Carlos Jesús Muvdi Nova. Reviewer: Janeth Aidé Perea Villamil

INTRODUCCIÓN

La industria de aromas y sabores utiliza alrededor de 700 materias primas (naturales o sintéticas) en cantidades mayores a 100 toneladas por año, y de éstas aproximadamente 300 corresponden a compuestos de origen vegetal, que pueden agruparse en tres grandes categorías: aceites esenciales, productos aislados de esencias y productos obtenidos por semisíntesis a partir de las esencias naturales [Swift; 2004].

Dentro de los componentes más importantes de los aceites esenciales se encuentran los alcoholes terpénicos y sus ésteres. Los terpenos son un grupo de compuestos lipídicos diverso y numeroso formado por alrededor de 30,000 sustancias que presentan diversas características [Carvalho y col., 2005]. Debido a su sabor y fragancia, son ampliamente utilizados en la industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica [Croteau R., 1980].

Aunque los ésteres terpénicos hoy en día son producidos por síntesis química, sus características organolépticas son superiores cuando se aíslan a partir de fuentes naturales [Bauer K, et al., 1990]; pero este último presenta el inconveniente de ser poco productivo. Una de las alternativas para mejorar la producción de estos compuestos es considerando su obtención por vía biotecnológica; aplicando técnicas y métodos como el uso de enzimas, uso de microorganismos y cultivo de tejido de células vegetales; lo que además les permitiría ser considerados como productos naturales según la normatividad legal [Anastas, P., et al. 2000; Demyttenaere, J. 2000].

En esta tesis se propone estudiar la reacción de alcoholólisis para la obtención de ésteres terpénicos utilizando materias primas provenientes de la cadena productiva de la industria del aceite de palma (aceite de palmiste) y los

aceites esenciales (Nerol y Geraniol), catalizada con una lipasa comercial de *Thermomyces lanuginosus* en un medio libre de solvente.

CAPÍTULO I. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS

1.1. GENERALIDADES

Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas; constituido generalmente por terpenos, terpenoides y compuestos de naturaleza aromática y alifática de bajo peso molecular que generan en conjunto el olor de la planta [Bandoni y col., 2000]. Los terpenos presentan propiedades organolépticas específicas que los ubican dentro de las materias primas más apetecidas en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética; debido a su uso como saborizantes y aromatizantes. El olor y el sabor característico de muchos alimentos se deben a la presencia de ésteres. La parte alcohólica del éster interviene en el aroma del mismo en forma más notable al aumentar su número de átomos de carbono y con la presencia de funciones insaturadas [Bourg-Garros, S. et al., 1998].

1.2. PRODUCCIÓN DE ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS

Los ésteres de alcoholes monoterpénicos se obtienen por métodos convencionales que incluyen la síntesis química, la fermentación directa o la extracción a partir de fuentes naturales; procesos que son poco productivos. Respecto a la síntesis química, ésta presenta limitaciones asociadas a la baja especificidad de los catalizadores dando lugar a productos de

composición química mixta, o productos contaminados que pueden tener un efecto adverso en las características finales del producto de interés [Semikolenov et al., 2001; Aguilar y col., 2005; Kolicheski et al., 2007]; además estos compuestos no son considerados productos naturales.

La síntesis de estos productos por vía enzimática o usando microorganismos aparece como una opción interesante para la solución de las problemáticas anteriormente presentadas. El principal interés está en que los productos obtenidos de estos procesos son considerados compuestos naturales y por lo tanto, tienen un mayor valor agregado en el mercado [García y col, 1999; Melo y col, 2005, Yadav y col., 2008]. El inconveniente principal de esta tecnología está en la dificultad actual de producción específica de compuestos en cantidades suficientes para hacer de éstos económicamente viables; limitantes que se verá superada con los avances científicos y tecnológicos en este tema.

ACTORES QUE PARTICIPAN EN LA REACCIÓN DE FORMACIÓN ÉSTERES DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS

1.3. GENERALIDADES

Los ésteres de Geraniol y de Nerol pueden ser sintetizados por vía biotecnológica utilizando enzimas. Las enzimas son excelentes catalizadores que trabajan en condiciones de operación que facilitan su manipulación, recuperación y reutilización. Igualmente, su alta estereoespecificidad (especificidad entre enantiómeros) y regioespecificidad (especificidad por grupos funcionales) permiten la síntesis de productos de gran aceptabilidad en la industria alimenticia por el alto grado de pureza de los mismos [Ghanem ashraf., 2007].

Para el presente estudio, la formación de ésteres de Geraniol y de Nerol se llevó a cabo empleando una reacción de alcoholisis catalizada vía enzimática utilizando la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.

1.4. FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS

El aceite de palmiste (PKO, por sus siglas en inglés) es una grasa en forma líquida o semisólida, de acuerdo con la temperatura ambiente, que contiene ácidos grasos saturados, ácidos mono insaturados, ácidos grasos poli insaturados y que es extraída de la almendra o palmiste.

La semilla o palmiste (Fig. 1) representa aproximadamente entre el 5 y el 12 % del peso del racimo del fruto de la palma africana (*E. guineensis*, Fig 2.), por consiguiente constituye un subproducto importante del proceso de extracción del aceite de palma [Pantzaris, T. 2001; Thin, T. 1992].

Figura 1. Fruto de la palma de aceite

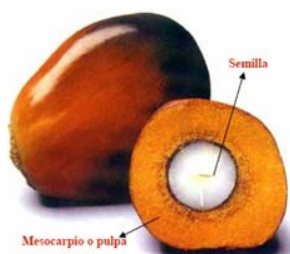


Figura 2. Palma africana de aceite

Sobre base húmeda, el palmiste contiene entre 47-50% en peso de aceite; y cuyas propiedades y características difieren considerablemente a las del aceite de la pulpa (aceite de palma). La composición del PKO, y por tanto sus propiedades, se asemejan a las del aceite de coco (CNO); pero pueden variar levemente dependiendo del fruto y su región de origen. En la Tabla 1, se muestra la composición típica de los aceites de palma, palmiste y coco [Pantzaris, T. 2001; Thin, T. 1992].

Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco

Ácido graso	Aceite de palma	Aceite de palmiste	Aceite de coco
Caprónico (C ₆)	-	0,3	0,4
Caprílico (C ₈)	-	4,2	7,3
Cáprico (C ₁₀)	-	3,7	6,6
Laúrico (C ₁₂)	0,2	48,7	47,8
Mirístico (C ₁₄)	1,1	15,6	18,1
Palmítico (C ₁₆)	44,1	7,5	8,9
Oléico (C _{18:0})	4,4	1,8	2,7
Linoléico (C _{18:1})	39	14,8	6,4
Linolénico (C _{18:2})	10,6	2,6	1,6
Otros	0,75	0,1	0,1

Fuentes: CICTA y Malasyan Palm Oil Board, 2001

De la Tabla 1 se observa que el PKO posee un contenido mayoritario de ácido laúrico (48,7%); clasificándolo dentro de los aceites laúricos junto con el aceite de coco.

El PKO no posee aplicaciones tan amplias en productos alimenticios como el aceite de palma, sin embargo presenta ácidos grasos de cadena intermedia (C₈-C₁₄) que lo hacen atractivo en la fabricación de detergentes y emulsificantes. El 70% de sus ácidos grasos poseen cadenas de carbono desde C₆ a C₁₄, y en total hasta el 50 % es ácido laúrico (C₁₂). El PKO está constituido por 87 triacilgliceroles diferentes catalogados en 13 grupos según su número de carbono, del C₃₀ al C₅₄, los cuales conforman el 99.9% de TAG's totales en el aceite [Young, F. 1983]. El Aceite de Palmiste posee usos similares al CON, tanto en el área alimenticia como no alimenticia, aunque existen pequeñas diferencias en su composición que los distinguen.

El PKO es más insaturado y por tanto puede ser hidrogenado generando un mayor rango de productos para la industria de alimentos [Castellanos y col. 2004].

1.5. ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS

Los terpenos son un grupo de compuestos lipídicos diverso y numeroso formado por alrededor de 30,000 sustancias que presentan diversas características y son parcial o totalmente insolubles en agua. Son compuestos derivados de la unión de unidades isopreno de 5-carbonos (C_5H_8); de ahí que se conozcan también como isoprenos o isoprenoides. Sus derivados oxigenados se conocen como Terpenoides, y pueden estar conformados por grupos funcionales éter, alcohol, ácido y éster [Armando et al., 2008].

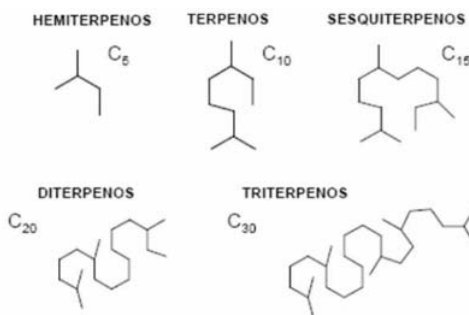


Figura 3. Estructura frecuente en terpenoides

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno, como lo muestra la Figura 3 [Stephen y col., 2008]. Los Terpenos son baratos, de fácil disponibilidad y renovables. Los monoterpenos, son sustratos que constituyen precursores adecuados e ideales como materiales de partida para la producción biotecnológica de compuestos naturales aromáticos [Demyttenaere, J. y De Kimpe, N., 2001].

El Geraniol (Fig. 4), 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol, se encuentra en casi todos los terpenos que contienen aceites esenciales, con frecuencia como un éster. El aceite de palmarosa contiene 70-85% de Geraniol, los aceites de geranio y aceite de rosa también contienen grandes cantidades de esta molécula. El Geraniol es un líquido incoloro, con un olor rosáceo [Bauer, K. y col., 1990].

El Nerol, cis-2,6-Dimethyl-2,6-octadien-8-ol ó cis-3,7-Dimethyl-2,6-otadien-1-ol, es el Z-enantiómero del Geraniol (Fig. 4) y se encuentra en pequeñas cantidades en muchos aceites esenciales en los que siempre se acompaña de Geraniol. Su nombre proviene de su presencia en el aceite de neroli.

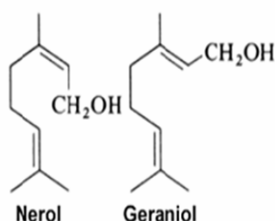


Figura 4. Estructura Molecular Nerol y Geraniol

El Geraniol y Nerol pueden ser encontrados en fragancias usadas para cosméticos decorativos, fragancias finas, champús, jabones y otros artículos de tocador, y en productos no cosméticos, como productos para la limpieza del hogar y detergentes (aroma dulce a rosa). Su uso a nivel mundial se encuentra en el rango de 100 – 1000 toneladas métricas por año [Lapczynski, A. y col., 2008].

1.6. CATALIZADOR: LIPASA DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

Las lipasas son enzimas de estructura proteica indispensables para la bioconversión de lípidos en el metabolismo de los organismos. A esto se suma que tienen un gran potencial en áreas como la tecnología de alimentos, ciencias biomédicas e industrias químicas. Poseen características que favorecen su uso como biocatalizadores e imparten especificidad a una reacción determinada. Adicionalmente, el uso de lipasas puede disminuir reacciones colaterales y simplificar los problemas de separación; además de menor consumo energético y un bajo nivel de productos de desecho [Gandhi, N., 2000; Pandey, A. y col., 1999; Quinlan y col., 1993; Villeneuve y col.,

1997]. De manera clásica, las enzimas se han utilizado para catalizar reacciones en fase acuosa; sin embargo diferentes estudios han demostrado que ellas pueden ser empleadas para catalizar reacciones de Síntesis en ausencia de agua [Gryglewicz, S. y col. 2000; Rodríguez, E., 2009; Yadav, G. 2003; Bourg-Garros, S., 1998].

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, utilizada en este estudio, es principalmente empleada como aditivo en detergentes (facilita la disolución de las grasas); pero su empleo como “reactivo” en síntesis orgánica en medio no acuoso, en forma liofilizada o inmovilizada, se está generalizando cada vez más [Pérez, I., 2006; Rodríguez, E., 2009; Yadav, G. 2008; Bourg-Garros, S., 1998; De Carvalho, C., et al., 2006; Demyttenaere, J., 2001; Athawale, V., 2002].

Variables a considerar en el proceso de producción de ésteres de alcoholes monoterpénicos

Para hacer viable industrialmente la producción enzimática de ésteres es necesario estudiar las variables que afectan el proceso y determinar los valores en los cuales se presentan altos rendimientos, mayor aprovechamiento de materia prima, y reducción de costos.

- ❖ Tiempo de reacción: En un proceso industrial se requieren tiempos de reacción cortos; actualmente alcanzados con catalizadores que efectúan conversiones completas en menos de una hora. Los procesos enzimáticos son más lentos debido a la naturaleza del biocatalizador, efecto que puede ser disminuido al ser optimizadas las condiciones de reacción [Nelson, L. et al., 1996; Uosukainen, E. et al., 1999; Wu W. et al., 1999].

- ❖ Temperatura: Las lipasas inmovilizadas tienen un rango óptimo de operación dentro de 40-70°C. Aunque pueden soportar temperaturas hasta de 130°C, es recomendable trabajar a temperaturas bajas para conservar su estabilidad por más tiempo [Turner, N. et al., 2000].
- ❖ Agitación: Las lipasas, inmovilizadas o no, son sensibles a fuerzas de cizalla creadas por empleo de agitación magnética o mecánica. Si este esfuerzo es excesivo propicia la fractura de los soportes poliméricos y la mayor desorción de la enzima. Se debe emplear agitación orbital lo suficientemente fuerte para evitar los problemas por difusión y transferencia de masa, pero no tan grande como para ocasionar su inactivación. Comúnmente se reportan velocidades de 200 a 400 rpm empleando agitación orbital [Arroyo, M., 1998; Nouredini, H. et al., 1997].
- ❖ Concentración de sustratos: El aceite por su naturaleza química no presenta una gran influencia ya que está conformado por TAG's no polares, sin embargo, el estado físico de los aceites y su miscibilidad con el alcohol determina la viscosidad del medio e influye en la conversión. Generalmente las reacciones se llevan a cabo a más de 40°C, temperatura a la cual los aceites y grasas se presentan en estado líquido, facilitando el contacto entre los sustratos [Garcés, I. y col., 1997].
- ❖ Concentración de enzima: En procesos industriales se requiere el empleo de cantidades de catalizador mínimas para disminuir costos e impacto ambiental. Por tales motivos, al trabajar con enzimas se busca emplear cantidades similares a las empleadas en la catálisis con bases iónicas, es decir del 0.5 a 1% peso de enzima con relación al peso de sustratos sin afectar la eficacia y la eficiencia de la reacción.

El empleo de una concentración mayor de enzima, en cierto intervalo, favorece la velocidad; y por tanto, disminuye el tiempo de reacción. Empleando lipasas inmovilizadas este factor es determinante desde el punto de vista económico [Moe, O. y col., 1988]. Debido al alto costo de las enzimas inmovilizadas no es probable el uso de concentraciones

mayores del 12% en peso con relación a los sustratos, no obstante concentraciones menores del 1% presentan velocidades iniciales bajas para llegar al equilibrio [Goma-Doncescu, N. y col., 1997; Mittelbach, M., 1990; Shimada, Y., 1999; Wu, W., 1999].

CAPITULO II. METODOLOGÍA

2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

El Geraniol y Nerol fueron obtenidos de Aldrich® con una pureza del 98% y 97% respectivamente. El aceite de palmiste refinado grado comestible RDB fue suministrado por C.I. Santandereana de Aceites –C.I. SACEITES S.A.-. Los demás reactivos empleados fueron grado analítico y los solventes necesarios para los análisis grado HPLC. La enzima de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme® TL inmovilizada en sílica gel) fue suministrada por Novozymes.

Etapas planteadas para la producción de ésteres de alcoholes monoterpénicos

Las Figura 5 resume las etapas propuestas para la producción de ésteres de alcoholes monoterpénicos; objeto de este estudio.

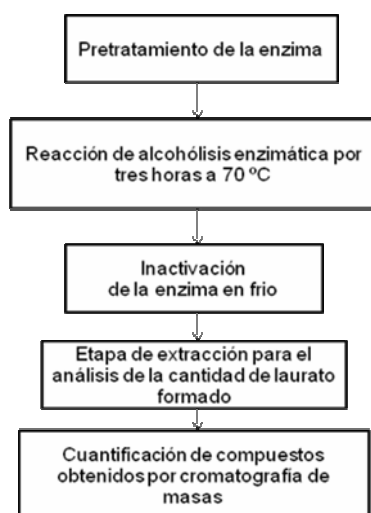


Figura 5. Diagrama de bloques de la metodología

2.2 PRETRATAMIENTO

La enzima fue sometida a un pretratamiento para eliminar el aire y el agua en exceso contenida en ella con el objetivo de prevenir la hidrólisis y también para asegurar que el aceite penetre los poros del soporte. Para la remoción del aire se aplicó vacío al sistema por 15 minutos. Posteriormente, y para eliminar la humedad excesiva presente en la enzima y asegurar que el aceite penetre los poros del soporte, se realizaron tres lavados con el doble de masa de aceite de palmiste a utilizar durante 30 min cada uno, cambiando el aceite en cada lavado.

2.3. ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA

La reacción de transesterificación se llevó en modo batch utilizando viales de 25 mL. La reacción se realizó en caliente a 70 ± 1 °C utilizando un baño termostático. Para su agitación, se utilizó un agitador magnético con diámetro de 1 cm. En todas las reacciones se emplearon como sustratos aceite de palmiste y Geraniol o Nerol.

Todas las reacciones se llevaron a cabo durante tres horas, en ausencia de agua. Esto con el objetivo de favorecer la reacción de alcoholisis como ha sido reportado por Iso y col., 2001; Castellanos y González, 2004., Nouredini y col.,2005.

Estudio de la influencia de las condiciones de operación en la producción de ésteres

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE REACCIÓN

Para el estudio y optimización de las variables de proceso se empleó la enzima Lipozyme TL IM en medio libre de solvente. Las variables independientes estudiadas fueron: relación alcohol:aceite, X_1 (mol:mol), cantidad de enzima, X_2 (porcentaje en peso con respecto al peso del aceite). Los niveles empleados para cada variable se presentan en la Tabla 2.

Como la reacción genera una mezcla variada de compuestos, se definió como única variable de respuesta al porcentaje de laurato (Geraniol o Nerol). Esta decisión se fundamenta en el contenido mayoritario de ácido laúrico en el aceite de palmiste (ver Tabla 1).

Tabla 2. Variables independientes y niveles de diseño

Variable Independiente	Símbolo	Código de los niveles		
		-1	0	1
Relación molar Aceite-Alcohol	X_1	1:3	1:3.5	1:4
Cantidad enzima	X_2	3%	6%	9%

La influencia de cada una de las variables y su interacción con la cantidad relativa de laurato formado, se estudió utilizando un diseño experimental de dos variables por tres niveles, con diseño central compuesto rotatorio de 2^3 + estrella (CCRD), utilizando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS Centurión XV para Windows. Cada experimento se realizó por duplicado, obteniéndose un total de 32 experimentos. Los puntos del diseño CCRD se muestran en el Anexo A.

En el estudio se mantuvieron constantes el tiempo de reacción (3 horas), la velocidad de agitación orbital (250 rpm), la temperatura (70°C) y la masa de aceite de palmiste empleado (2.5 g). Estos valores y los intervalos en los cuales se evaluaron las variables de estudio, se eligieron en base a

investigaciones realizadas anteriormente en el CICTA, donde se encontró que las restricciones difusionales externas pueden ser reducidas usando velocidades de agitación mayores a las 200 rpm y para la temperatura existe una correlación positiva y directa entre ésta variable y la formación de ésteres. [Castellanos, F. et al., 2004; Rodríguez, E. et al., 2006].

2.5. EXTRACCIÓN

Para la extracción de los productos de la reacción se tomaron 250 μL de la mezcla reaccionante que se trataron con 4 volúmenes de hexano/diclorometano (1:1, v/v) y dos volúmenes de cloruro de sodio saturado. La solución se agitó con ayuda de un vortex y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se tomó la capa superior y a la capa inferior se le adicionó nuevamente solución de hexano/éter, se agitó y centrifugó. Las capas superiores fueron tratadas con sulfato de sodio anhidro. De esta solución se tomaron 150 μL para su respectivo análisis por cromatografía de gases CG-FID.

Previamente se determinó el porcentaje de recuperación del método empleado para la extracción de los ésteres formados, en base a lo reportado por los cromatogramas. Para el Geraniol se obtuvo un porcentaje de recuperación de 83 % y para el Nerol de 77,6%.

2.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO DE GERANIOL Y NEROL

Para el análisis de los productos de la reacción se empleó un cromatógrafo Agilent HP 6890 Plus con detector TCD, una columna HP – 5MS (30m x 0.25

mm x 0.25 μ m) con la siguiente programación de temperatura: 130 °C mantenidos por 2 minutos, una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta 170°C, 170 °C mantenidos por 5 minutos seguida por una rampa de calentamiento de 25 °C/min hasta 280 °C finalmente se mantuvo una temperatura de 280 °C durante 30 min. La identificación de cada componente se hizo de acuerdo a su tiempo de retención, empleando como referencia el sistema utilizado MSD ChemStation G1701DA D.02.00.275 y las librerías de espectros de masas: NBS 75K, WILEY 138K, NIST02 y QUADLIB 2004.

2.7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO EXPERIMENTAL

Una vez escogidas las mejores condiciones de reacción para la formación del Laurato se procedió a hacer una prueba por triplicado para determinar la conversión total del alcohol a ésteres mediante el mismo método de análisis descrito anteriormente.

Estudio de la cinética de la reacción

Con las condiciones de operación adecuadas para la obtención del laurato, se realizó el seguimiento de la reacción en el tiempo (30, 60, 90, 120 y 180 min), con el fin de evaluar las variaciones en la formación de Laurato.

Reutilización de la enzima TL IM

El estudio del reuso del catalizador se llevó a cabo para determinar la estabilidad de la enzima durante reacciones de alcoholisis sucesivas. La enzima se utilizó bajo las mismas condiciones de operación, seleccionadas con el diseño experimental. Después de cada etapa de reacción, la enzima se lavó con diclorometano como disolvente (4 veces) y se secó a temperatura ambiente antes de su reutilización.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan y analizan los resultados obtenidos al aplicar un diseño experimental, estableciendo las mejores condiciones de reacción de alcoholólisis en un sistema en discontinuo a escala de laboratorio. Dichas condiciones de reacción fueron utilizadas experimentalmente para evaluar la estabilidad operacional de la enzima *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL, IM), así como la cinética de la reacción.

3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

Para evaluar las variables de la reacción (relación de sustratos y cantidad de enzima) sobre la variable de respuesta, se utilizó un diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta, como se describió en el numeral 3.1 del capítulo 2. Para el análisis de los valores obtenidos se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurión XV, y se realizó como sigue:

- a) Evaluación del diagrama de efectos principales; destacando la influencia que tiene cada variable en forma individual sobre las variables de respuesta de la reacción de alcoholólisis.
- b) Análisis de varianza (ANOVA) para mostrar los efectos que tienen significancia estadística; y utilización del diagrama de pareto, donde se muestran los efectos en el orden decreciente de importancia.
- c) Desarrollo de un modelo matemático que relaciona cada variable de respuesta con las variables independientes y determinación de los respectivos coeficientes de regresión

d) Desarrollo gráfico de las superficies de respuesta, las cuales permiten visualizar los efectos de las interacciones entre las variables

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos (lauratos de geraniol y de nerol formado) de la ejecución del diseño experimental en función de la relación de sustratos y de la cantidad de enzima.

Tabla 3. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto 2 3 + estrella (CCRD) aplicado a la reacción de alcoholisis

Experimento	Relación Sustratos (mol/mol)	Cantidad de enzima (% p/p)	Laurato de Geraniol formado (%)	Laurato de Nerol formado (%)
1	3	9	50,6	51,1
2	3,5	6	41,4	44
3	3,5	6	42,2	39,3
4	4,2	6	39,7	38,2
5	3,5	6	40,3	41,4
6	3,5	10,2	47,2	50,5
7	3,5	6	36,9	40,5
8	4	9	45,6	46,9
9	3,5	6	40,4	40,8
10	3,5	6	38,6	39,4
11	2,8	6	42,8	40,5
12	3,5	6	42,4	39,4
13	3,5	1,8	26,9	21,5
14	3	3	32,1	29,9
15	3,5	6	39,8	39,1
16	4	3	28,9	26,5

Al representar los resultados promedio obtenidos para la formación del Laurato de Geraniol y de Nerol (Fig. 6) se puede observar la misma tendencia en los valores obtenidos para las dos variables de respuesta. Lo cual puede explicarse en que el Nerol es el Z-enantiómero del Geraniol (ver Figura 4).

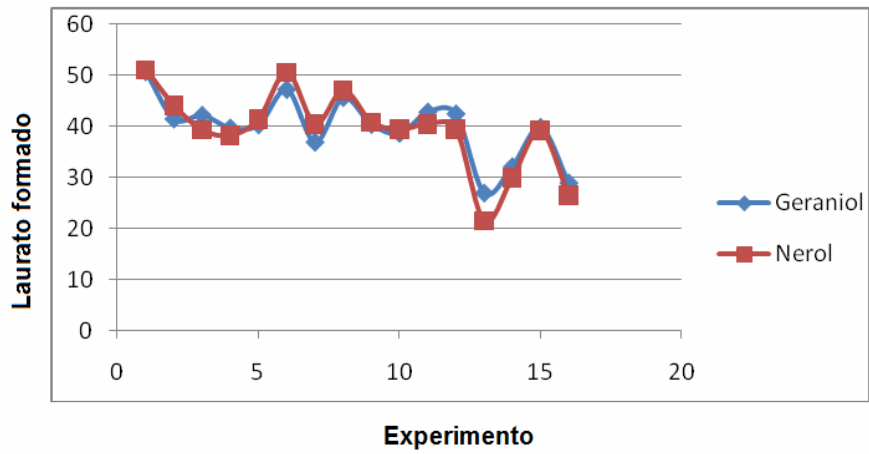


Figura 6. Comparación de la tendencia de formación de laurato de Geraniol y Nerol según diseño experimental

El diagrama de efectos principales sobre la formación de laurato de Geraniol o de Nerol, se muestra en las figuras 7 y 8. Estos diagramas muestran la influencia que cada una de las variables de proceso tienen sobre la variable de respuesta (Laurato formado).

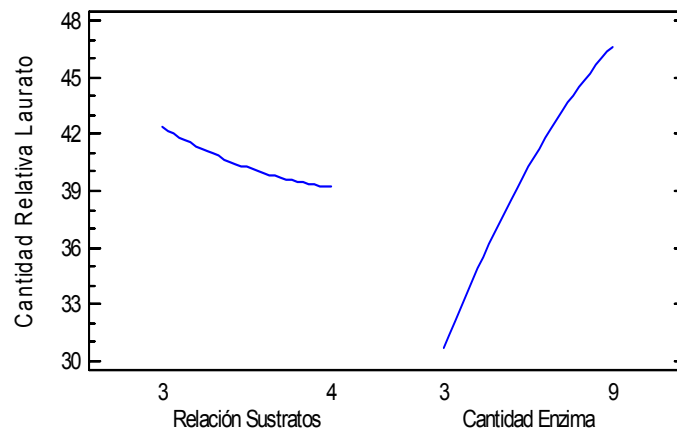


Figura 7. Diagrama de efectos principales para Y1 (Laurato de geraniol formado)

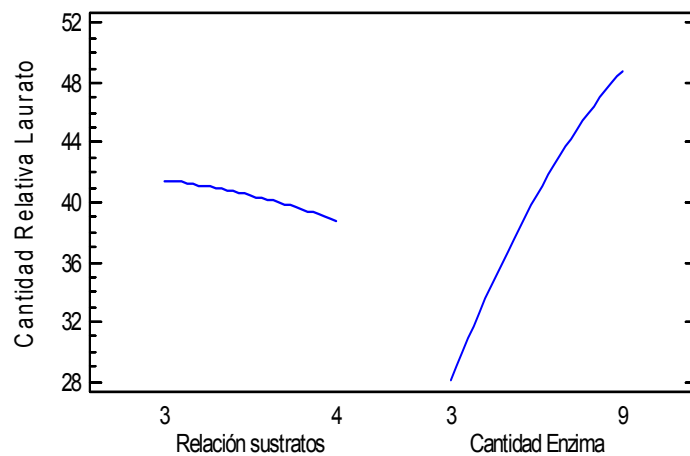


Figura 8. Diagrama de efectos principales para Y2 (Laurato de nerol formado)

En el caso de la relación molar de sustratos (mol aceite de palmiste: mol alcohol) se evidencia que un aumento de esta variable con respecto al alcohol genera una disminución de la cantidad relativa de Laurato (de geraniol o de nerol) formado (a recordar que el aceite de palmiste se encuentra en exceso). Esto significa que el alcohol monoterpénico puede tener un efecto de inhibición sobre la enzima.

Es a recalcar que estos resultados muestran una tendencia contraria a los obtenidos por Gandhi, N. et al., 2000; HSU, A. et al., 2002; Castellanos, F., 2004; en donde el aumento de la relación molar de los sustratos induce un aumento de la formación de ésteres. Cabe señalar que los estudios anteriores se realizaron utilizando alcoholes lineales de bajo peso molecular y no alcoholes ramificados como fue el caso en este estudio. Esta diferencia en los resultados podría ser causada por un impedimento estérico generado al utilizar moléculas ramificadas de mayor peso molecular (Geraniol y Nerol); haciendo difícil el acoplamiento de la lipasa con los sustratos y disminuyendo el rendimiento de la reacción de alcoholólisis.

En el caso del porcentaje de enzima (% p/p) se observa que el aumento en su valor conduce a un aumento en la formación de ambos lauratos. Este

comportamiento se explica considerando que una mayor cantidad de enzima representa más disponibilidad de sitios activos para interactuar con los sustratos.

Posteriormente, se aplicó el análisis de la varianza, ANOVA. (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y₁ (Laurato de geraniol formado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A:Relación Sustratos	19,855	1	19,855	6,50	0,0289
B:Cantidad Enzima	508,481	1	508,481	166,53	0,0000
AA	2,32283	1	2,32283	0,76	0,4035
AB	0,8649	1	0,8649	0,28	0,6062
BB	19,0157	1	19,0157	6,23	0,0317
Total error	30,5331	10	3,05331		
Total (corr.)	580,939	15			

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y₂ (Laurato de nerol formado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
A:Relación sustratos	14,2995	1	14,2995	6,16	0,0324
B:Cantidad Enzima	854,341	1	854,341	368,30	0,0000
AA	0,873486	1	0,873486	0,38	0,5532
AB	0,112225	1	0,112225	0,05	0,8303
BB	31,9655	1	31,9655	13,78	0,0040
Total error	23,1969	10	2,31969		
Total (corr.)	924,9	15			

Con estos resultados, se encontró que la cantidad de enzima y la relación de sustratos, así como la interacción enzima-enzima tienen efectos estadísticamente significativos sobre las dos variables de respuesta

evaluadas (Cantidad relativa de laurato de Geraniol y Cantidad relativa de laurato de Nerol); estas variables poseen un valor de p (nivel de significancia) menor que 0,05 indicando que son influyentes en el proceso con un 95% de confianza.

Los resultados obtenidos se corroboran con el diagrama de Pareto (Figura 9 y 10 respectivamente), donde se muestra cada efecto en orden decreciente de magnitud.

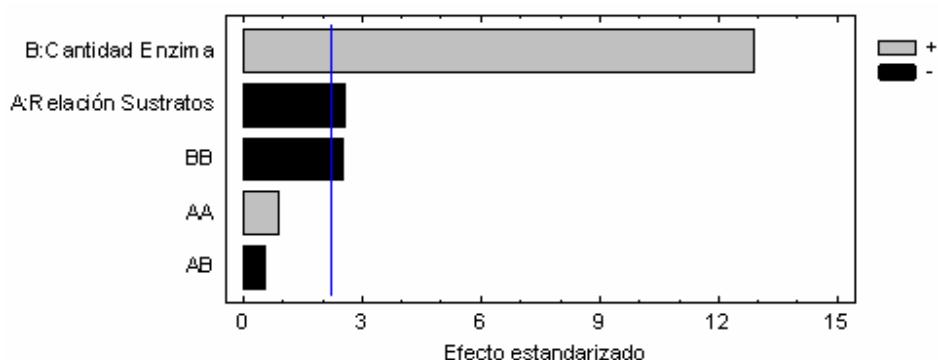


Figura 9. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta (Laurato de geraniol formado)

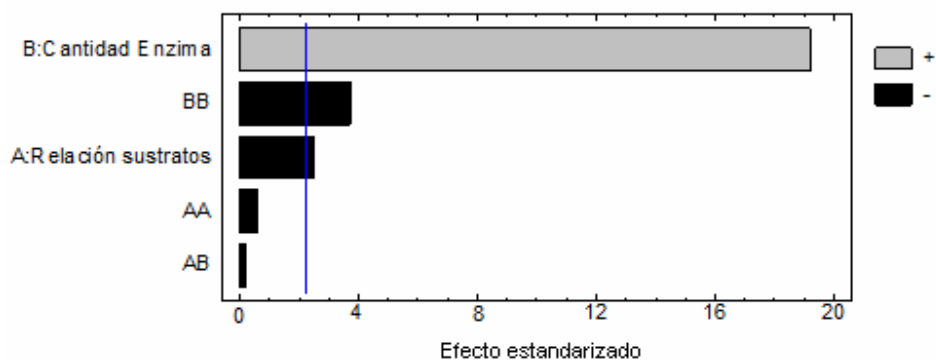


Figura 10. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta (Laurato de nerol formado)

La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar). Las barras que se extienden mas allá de la línea azul corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95 %. Los efectos señalados con gris inciden favorablemente sobre el porcentaje de conversión y los que aparecen en negro poseen una incidencia desfavorable sobre el mismo.

Estos diagramas corroboran la importancia de estas dos variables en el proceso (bajo las condiciones de operación estudiadas); y en principal medida para la variable "Cantidad de enzima".

Con los datos obtenidos se realizó una regresión múltiple polinómica obteniendo un modelo matemático (Ecuación 1 y 2 respectivamente) que describe el proceso:

$$Y_1 = 49,3314 - 16,6239 * X_1 + 5,84281 * X_2 + 2,18817 * X_1^2 - 0,31 * X_1 * X_2 - 0,173911 * X_2^2 \text{ Ecuación 1} \quad (1)$$

$$Y_2 = 2,20611 + 7,37553 * X_1 + 6,55865 * X_2 - 1,34184 * X_1^2 - 0,111667 * X_1 * X_2 - 0,225482 * X_2^2 \text{ Ecuación 2} \quad (2)$$

Donde:

- Y_1 : Laurato de Geraniol formado (%)
- Y_2 : Laurato de Nerol formado (%)
- X_1 : relación molar alcohol/aceite
- X_2 : cantidad de enzima (% p/p)

Para la ecuación 1, que describe la formación de Laurato de Geraniol, el valor de R^2 es de 0,947442 indicando que el modelo matemático explica el 94,7% de la variabilidad de Y_1 . Para la ecuación 2, que describe la formación

de Laurato de Nerol, el valor R^2 es de 0,9742 indicando que el modelo matemático explica el 97,4% de la variabilidad de Y2.

Empleando las ecuaciones 1 y 2 se obtuvieron las superficies de respuesta que permiten realizar predicciones del comportamiento de las variables dentro de los intervalos estudiados. Se observa que existe un máximo en la variable de respuesta Y1 y Y2 cuando la cantidad de enzima está en su punto más alto y cuando la relación de sustratos es menor (Figura 11 y Figura 12).

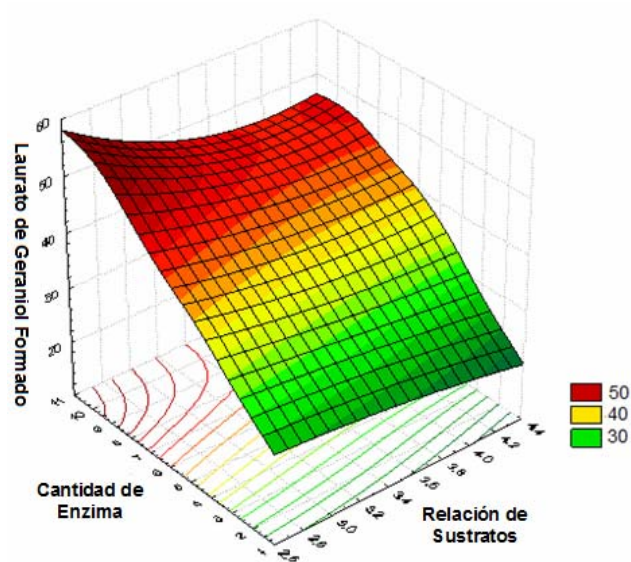


Figura 11. Superficie de respuesta del Laurato de geraniol formado

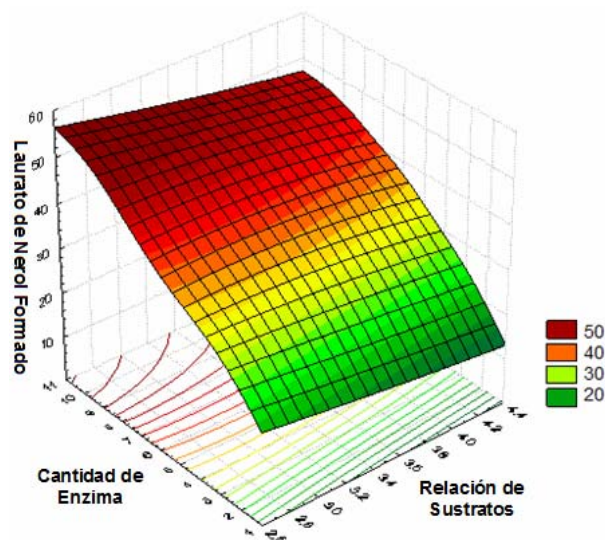


Figura 12. Superficie de respuesta del laurato de nerol formado

Con base en estos resultados, se aplicó la *metodología de optimización multivariable*, con la cual se analiza de forma simultánea el efecto de las dos variables analizadas sobre las variables de respuesta Y1 y Y2 a fin de establecer las condiciones de reacción, en las cuales se maximiza la cantidad relativa de Laurato de Geraniol y Nerol. En la Tabla 6 y la Tabla 7, se relaciona el conjunto de condiciones obtenidas de este análisis.

Tabla 6. Combinación de factores y niveles que maximizan la formación de laurato de geraniol

Factor	Nivel Mínimo	Nivel Máximo	Óptimo
Relación sustratos	2,8	4,2	2,8
Cantidad Enzima	1,8	10,2	10,2
Valor estimado de Laurato de Geraniol formado (%)		52,5891	

Tabla 7. Combinación de factores y niveles que maximizan la formación de laurato de nerol

Factor	Nivel Mínimo	Nivel Máximo	Óptimo
Relación sustratos	2,8	4,2	2,8
Cantidad Enzima	1,8	10,2	10,2
Valor estimado de Laurato de Nerol formado (%)		52,5874	

3.2. PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE LAURATO EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN

Con las condiciones de reacción seleccionadas (ver Tabla 6 y 7) se alcanzaron niveles de formación del Laurato de Geraniol del 33,9% y del Laurato de Nerol de 29,5%. Dichos valores corresponden solo al 60% del valor óptimo esperado (ver valor estimado Tablas 6 y 7). Estos resultados pueden explicarse en que se trabajó por debajo de la relación molar recomendada en los estudios realizados por Abigor y col., (2000); Oliveira y col., (2001); Du y col., (2003); Wu y col., (2003); Castellanos y González., (2004); quienes recomiendan el uso de un ligero exceso de alcohol (relación molar mayor de 1:3) para desplazar el equilibrio hacia la reacción de esterificación; consideración que no tiene en cuenta el programa de análisis estadístico.

Al comparar los rendimientos de formación del Laurato de Geraniol y Laurato de Nerol se obtiene que para el primero son mayores los porcentajes de formación a las mismas condiciones. La razón probable podría ser impedimento estérico encontrado en el sitio activo de la enzima, debido a la orientación *Cis* alrededor del doble enlace presente en el Nerol [V. Athawale *et al.*, 2002].

3.3. CINÉTICA DE LA REACCIÓN

En las condiciones seleccionadas, se evaluó la formación de laurato en función del tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

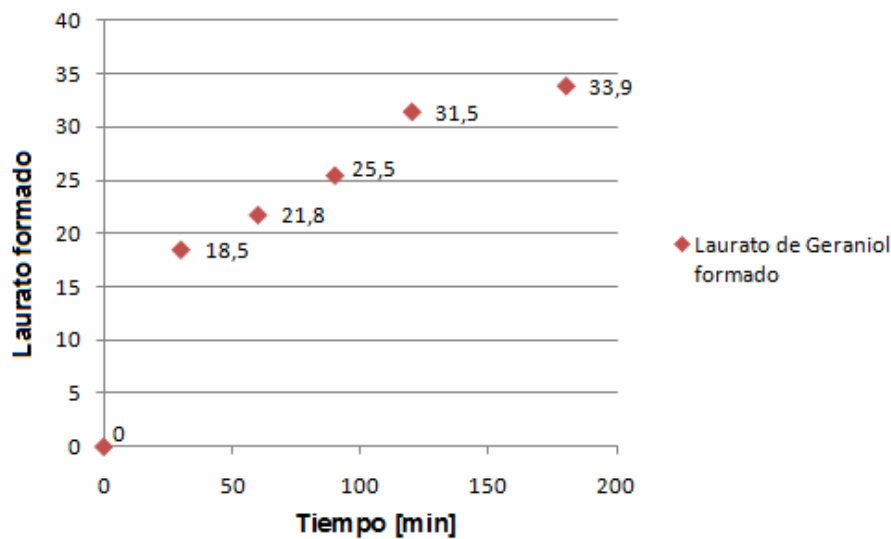


Figura 13. Cinética de la reacción de alcoholísis

De la Figura 13 se observa que la producción de laurato aumenta rápidamente durante la primera hora de reacción. Al cabo de este tiempo, la velocidad de formación de laurato va disminuyendo, de forma que entre 120 y 180 minutos solo se registra un aumento del 7,6%. Lo anterior, permite establecer un tiempo de reacción de dos horas fundamentado en que a los 120 minutos se obtiene el 93% de la formación total posible y los costos asociados a un proceso a escala industrial no justificarían la operación en un tiempo mayor.

3.4. VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA

Con el fin de determinar la estabilidad operativa (capacidad catalítica) de la enzima, se realizaron cuatro reacciones de alcoholísis sucesivas utilizando la misma enzima y bajo las condiciones de reacción escogidas en el diseño experimental (ver Tabla 6). La Figura 14, muestra el rendimiento de la reacción en función de los reusos aplicados.

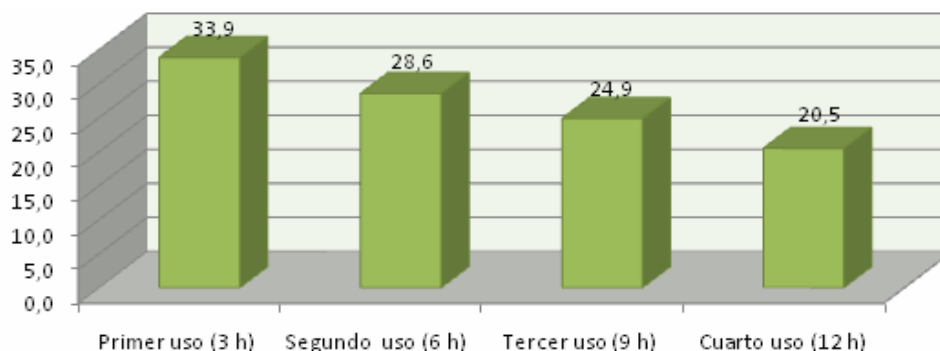


Figura 14. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL IM en las condiciones óptimas finales

De la Figura 14 se observa que después del primer uso (después de 3 horas de reacción) se obtienen rendimientos que superan el 30%, en el segundo la conversión se reduce a 28,6 %, con el tercero el rendimiento de la reacción es del 24,9% y finalmente para el cuarto la conversión es de apenas el 20.5%. Es decir, después de cuatro usos (12 horas) la disminución del rendimiento de la reacción es del 39%. Es importante mencionar que estudios anteriores demuestran que las etapas de lavado (numeral de la enzima entre cada reacción no generan cambios en la actividad de la enzima [Rodríguez, E. y col., 2006].

Otros estudios sobre el tema (estabilidad de la Lipozyme TL IM) como lo son los trabajos reportados por Soumanou y col., 2003, Castellanos y col., 2004 y Ganapati D. y col., 2004 señalan que la enzima puede perder entre el 50% y el 70% de su actividad inicial luego de llevarse a cabo reacciones entre 6 y 48 horas. Lo que muestra que nuestros resultados tienen la misma tendencia. Dicha disminución de la conversión puede ser consecuencia de la inactivación térmica, la posible degradación, pérdida de enzima por el proceso de lavado y secado y/o la desorción de la enzima del soporte [Yadav, D., 2004; Rodríguez, E. y col., 2006]. Faltan estudios científicos que permitan identificar el nivel de incidencia de cada una de ellas.

CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la formación de Laurato de Geraniol y Laurato de Nerol a través de la reacción de alcoholólisis partiendo de aceite de palmiste y usando como catalizador la lipasa Lipozyme® TL-IM en un medio libre de solvente, alcanzándose un valor máximo de formación del 33,9% - 29,5% a 70°C, 3h de reacción, relación molar de sustratos aceite/ alcohol 1:2,8 y cantidad enzima con respecto al peso del aceite inicial del 10,2%. Sin embargo, los porcentajes de formación no fueron los esperados; lo que evidencia la necesidad de continuar con estudios enfocados a mejorar el rendimiento del proceso.
- ✓ Se encontró que la cantidad de enzima actúa significativamente sobre la formación del laurato y que la relación molar de sustratos lo hace de forma negativa.
- ✓ Examinando la relación costo/beneficio se observó que la reacción debería realizarse hasta un máximo de dos horas, donde se ha alcanzado el 93% de lo que se debe formar de laurato. Después de este tiempo la velocidad de formación de Laurato disminuye considerablemente lo que no justificaría extender el proceso más allá de este periodo.
- ✓ Los resultados muestran que la Lipozyme TL-IM disminuye considerablemente su actividad catalítica luego del cuarto uso en un 39% en la formación de Laurato. Esto plantea la necesidad de conocer como las variables del proceso afectan la actividad de la enzima.

PERSPECTIVAS

- Profundizar en el estudio del efecto de la geometría y estructura molecular de los sustratos sobre la actividad catalítica de la enzima, para determinar los tipos de sustratos que darían mayor rendimiento en las condiciones de operación seleccionadas.
- Se recomienda continuar los estudios de obtención de ésteres de Geraniol y Nerol enfocados a profundizar sobre el mecanismo cinético de la reacción. Esto con el objetivo de mejorar la estabilidad térmica de la enzima y de aumentar el rendimiento de la reacción.
- Igualmente será necesario estudiar la reacción de alcoholisis empleando un sistema en continuo, debido a que el comportamiento de las variables puede ser diferente que en un sistema por lotes; lo anterior pensando en un proceso a escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abigor, R *et al.* Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. En: Biochemical Society Transactions. Vol. 28, No. 6 (2000); p. 979-981
- ❖ Aguilar, A.E. *et al.* Synthesis of terpineol from α -pinene by homogeneous acid catalysis En: Catalysis Today Vol. 107–108 (2005); p. 310–314
- ❖ Anastas, Paul T. *et al.* The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry. Catalysis Today. 2000, 55: 11-22
- ❖ Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. En: Ars Pharmaceutica. Vol. 39, No. 2 (1998); p. 23-39
- ❖ Athawale V., Manjrekar N. and Athawale M. Lipase-catalyzed synthesis of geranyl methacrylate by transesterification: study of reaction parameters. In Tetrahedron Letters 43 (2002) 4797–4800
- ❖ Bandoni, A. *et al.* “Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica”. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata - Argentina. (2000)
- ❖ Bauer, K., Garbe, D. and Surburg, H. (eds.) (1990) *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*. Second, revised edition. VCH Publishers, New York, NY (USA), 218 pp.
- ❖ Bourg-Garros, S., Razafindramboa N., and Pavia, A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-y1 acetate by direct

esterification in hexane and a solvent-free médium. *Enzyme and Microbial Technology* 22:240-245, 1998

- ❖ Castellanos Molina, Fabián Enrique y González Santos, Rosa Alexandra. Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholísis del aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de *Mucor miehei*. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 2004.
- ❖ Croteau, R. *Fragrance and Flavor Substance*, D&PS Verlag, Germany, 1980, pp. 13–14.
- ❖ De Carvalho, Carla C.C.R., Da Fonseca M. Manuela R. Biotransformation of terpenes. En: *Biotechnology Advances* 24 (2006) p.134– 142
- ❖ Demyttenaere J, De Kimpe N. Biotransformation of terpenes by fungi Study of the pathways involved. *J Mol Catal, B Enzyme* 2001;11:265–70
- ❖ DU, W; XU, Y. and LIU, D. Lipase catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. En: *Biotechnol. Apply. Biochem.* Vol. 38 (2003); p. 103-106
- ❖ Ganapati D., Piyush S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. En *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27 (2004) 113–119.
- ❖ Gandhi, N. et al. Lipase catalyzed esterification. En: *Catal. Rev. Sci. Eng.* Vol. 42, No. 4 (2000); p. 439-480
- ❖ Garcés, I. y Cuellar, M. Productos derivados de la industria de aceite de palma. Usos. En: *Palmas.* Vol. 18, No. 1 (1997); p. 33-47

- ❖ Garcia, T. *et al.* Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. kinetic approach. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 25 (1999); p. 584-590

- ❖ Goma-Doncescu, N. and Legoy, M. An original transesterification route for fatty acid ester production from vegetable oils in a solvent - free system. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 74, No. 9 (1997); p. 1137-1143

- ❖ Gryglewicz, S., Jadownicka, E., Czerniak, A. Biotech. Lett. 22 (2000) 1379–1382.

- ❖ Hsu, A. *et al.* Immobilized lipase catalyzed production of alkyl ester of restaurant grease as biodiesel. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 36 (2002); p. 181-186

- ❖ Iso, Mamoru, *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 16, N° 1 (2001), p. 53-58

- ❖ Kolicheski M.B. *et al.* Synthesis of myrcene by pyrolysis of β -pinene: Analysis of decomposition reactions. En: J. Anal. Appl. Pyrolysis. Vol. 80 (2007); p. 92–100

- ❖ Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Foxenberg, R.J., Letizia, C.S., Api, A.M. Fragrance material review on geraniol and nerol. En: Food and Chemical Toxicology 46 (2008) p. 241–244, p. 160–170

- ❖ Melo, L.L.M.M.; Pastore, G.M. and Macedo, G.M. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus sp.* En: Process Biochemistry. Vol. 40 (2005); p. 3181-3185

- ❖ Mittelbach, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 67, No. 3 (1990); p. 168-170

- ❖ Moe, O. and Cornelius, R. Enzyme kinetics. En: J. Chem. Edu. Vol. 65, No. 2 (1988); p. 137-141

- ❖ Nelson, L. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 73, No. 8 (1996); p. 1191-1195

- ❖ Nouredдини, H. and ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 74, No. 11 (1997); p. 1457-1463

- ❖ Nouredدین, H; GAO X. and Philkana R. S. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. En: Bioresource Technology. Vol. 96 (2005); p. 769-777

- ❖ Oliveira, D. and Oliveira, Vladimir J. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexano and SCCO₂. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol. 19 (2001); p. 141-148

- ❖ Pandey, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 29 (1999); p. 119-131

- ❖ Pantzaris, T and Ahmad, M. Techno-economic aspects of palm kernel oil. En: INFORM. Vol. 12 (2001); p. 69-80

- ❖ Pérez-Victoria Moreno de Barreda, Ignacio. Acilaciones regioselectivas de Oligosacáridos catalizadas por enzimas: Caracterización y propiedades de los Productos. Tesis de grado para optar el título de Doctor. Universidad de Granada. Granada, España. 2006

- ❖ Quinlan, P and Moore, S. Modification of triglycerides by lipases : process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. En: INFORM. Vol. 4, No. 5 (1993); p. 580-58

- ❖ Rodríguez, E. y Amado, M. Estudio de la obtención de esteres etílicos por transesterificación, usando lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus*. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 2006

- ❖ Rodríguez, E. Obtención de ésteres de citronelol por vía enzimática Estudio cinético. Tesis de grado para optar el título de Msc en Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 2009

- ❖ Semikolenov, V.A.; ILYNA, I.I. and Simakova I.L. Linalool synthesis from α -pinene: kinetic peculiarities of catalytic steps En: Applied Catalysis A: General Vol. 211 (2001); p. 91–10

- ❖ Shimada, Y. et al. Conversión of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida Antarctica* lipase. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 76, No. 7 (1999); p. 789-793

- ❖ Soumanou, Mohamed M. and Bornscheuer, Uwe T. Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol 33, No. 1 (2003); p. 97-103

- ❖ Swift A.D. Karl. Catalytic transformations of the major terpene feedstocks. En: Topics in Catalysis. Vol. 12 N° 2 (2004), p. 131 – 141

- ❖ Turner, N. and Vulfson, E. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 27, No. 1-2 (2000); p. 108-113

- ❖ Thin, T. Calidad actual del palmiste y del aceite de palmiste. En: Palmas. Vol. 13, No. 4 (1992)

- ❖ U. Krings, R.G. Berger, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 (1998)

- ❖ Uosukainen, E. and Lamsa, M. Optimization of enzymatic transesterification of rapeseed oil ester using response surface and principal component methodology. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 25 (1999); p. 236-243

- ❖ Villeneuve, P. and Foglia, T. Lipase specificities. Potencial application in lipid bioconversions. En: INFORM. Vol. 8, No. 6 (1997); p. 640-650

- ❖ Wu, W. et al. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 76, No. 4 (1999); p. 517-521

- ❖ Yadav, G.D. and Shrikant B. D. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Vol. 57 N° 1-4 (2008); p. 34 -39

- ❖ Yadav, Ganapati D., Piyush, S. LathiSynthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 27 (2004) 113–119

- ❖ Young, F. Palm kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 60, No. 2 (1983); p. 374-379

ANEXOS

**Anexo A. Diseño de experimentos para el diseño central compuesto 2 3
+ estrella**

Relación de sustratos	Cantidad de enzima		
-1	1	3	9
0	0	3,5	6
0	0	3,5	6
1,41421	0	4,2	6
0	0	3,5	6
0	1,41421	3,5	10,2
0	0	3,5	6
1	1	4	9
0	0	3,5	6
0	0	3,5	6
-1,41421	0	2,8	6
0	0	3,5	6
0	-1,41421	3,5	1,8
-1	-1	3	3
0	0	3,5	6
1	-1	4	3
-1	3	-1	3
0	3,5	0	6
1	4	1	9
1,41421	4,207105	1,41421	10,24263
-1,41421	2,792895	-1,41421	1,75737