

**EVALUACIÓN DE LIPASAS COMERCIALES EN LA PRODUCCIÓN DE
GLICÉRIDOS PARCIALES A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS Y
ESTEARINA DE PALMA**

ERWIN VILLAMIZAR ARIZA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE ANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**EVALUACIÓN DE LIPASAS COMERCIALES EN LA PRODUCCIÓN DE
GLICÉRIDOS PARCIALES A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS Y
ESTEARINA DE PALMA**

ERWIN VILLAMIZAR ARIZA

**DIRECTOR:
FERNANDO MARTINEZ O.
Químico MSc Doctor en Química**

**CORDIRECTORA:
JANETH AIDÉ PEREA V.
Química MSc Doctora en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE ANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

DEDICATORIA

A Dios por la fuerza de voluntad que me dio para culminar satisfactoriamente este trabajo.

A mis padres en especial al mi madre Lucila Ariza y Mateo Villamizar, quienes me apoyaron en todo momento.

A mi novia Mónica por su comprensión y colaboración en este trabajo.

A todos mis compañeros con quienes compartimos momentos gratos y difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Martínez y a la Dra. Yaheth Aidé Perea Villamil, por su acertada dirección en este trabajo.

A Alejandro Torres, Técnico de la Escuela de Química por su colaboración.

A Nelson Moreno, por sus valiosas recomendaciones.

A los compañeros del CICTA, especialmente Fabián Castellanos.

A SACEITES S.A., por suministrar parte de la materia prima.

A la Universidad Industrial de Santander.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA	3
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2 GLICERÓLISIS Y ESTERIFICACIÓN DE ACEITES Y GRASAS	4
1.3 USO DE LAS LIPASAS PARA LA PREPARACIÓN DE GLICÉRIDOS PARCIALES.	5
1.4 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE PALMA EN COLOMBIA	11
1.5 USOS DE LA ESTEARINA Y LOS ÁCIDOS GRASOS DE PALMA	14
1.6 APLICACIONES ACTUALES DE LOS GLICÉRIDOS PARCIALES	15
2. METODOLOGÍA	16
2.1 MATERIALES	16
2.2 MÉTODOS	16
2.2.1 Evaluación de Lipasas Comerciales	16

2.2.2 Determinación de la Glicerólisis de la Estearina de Palma Utilizando Emulsificantes (Poliéster de Glicerol y Goma Arábica)	18
2.2.3 Evolución de la Glicerólisis de la Mezcla de Ácidos Grasos y Estearina de Palma en Función del Tiempo.	18
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS	19
2.3.1 Determinación del Grado de Hidrólisis	19
2.3.2 Determinación de la Actividad Hidrolítica de las Lipasas	20
2.3.3 Metilación con Trifluoruro de Boro (BF ₃) en Metanol	20
2.3.4 Análisis de Ácidos Grasos	21
2.3.5 Análisis de Acilglicéridos por GC	23
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
3.1 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	26
3.1.1 Separación, Identificación y Cuantificación de Ácidos Grasos Como Metil Ésteres (FAME) por GC	26
3.1.2 Identificación y Cuantificación de los Acilglicéridos por GC	29
3.2 EVALUACIÓN DE PREPARADOS COMERCIALES DE LIPASAS	31
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE PARTIDA Y PRODUCTOS DE REACCIÓN	32

3.3.1 Composición en Ácidos Grasos y Acilgliceridos de las Materias Primas.	32
3.3.2 Productos de la Reacción Enzimática.	34
3.3.3 Efecto de los Emulsificantes: Poliéster de Glicerol y Goma Arábica en la Glicerólisis de la Estearina de Palma.	43
3.3.4 Efecto del Tiempo de Reacción en la Obtención de los Glicéridos Parciales.	46
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Revisión de condiciones de reacción para la obtención de mono y diglicéridos con distintas grasas y aceites.	10
Tabla 2. Revisión de condiciones de reacción para la obtención de monoglicéridos a partir de distintos ácidos grasos.	11
Tabla 3. Composición (%) en ácidos grasos del aceite de palma y sus fracciones obtenidas por diferentes tratamientos.	12
Tabla 4. Composición (% mol) en triacilglicéridos del aceite de palma y sus Fracciones	13
Tabla 5. Descripción del producto, mezcla de ácidos grasos obtenidos del Aceite de Palma Africana.	14
Tabla 6. Condiciones de reacción para el sistema estearina/glicerol	17
Tabla 7. Condiciones de reacción para el sistema ácidos grasos/glicerol	18
Tabla 8. Condiciones cromatográficas de reacción	22
Tabla 9. Concentración (mg/ml) de metil ésteres de los patrones de ácidos grasos.	22
Tabla 10. Composición (%) de la mezcla de monoglicéridos DIMODAN PO	24
Tabla 11. Ecuaciones para la cuantificación de los ácidos grasos por GC.	27
Tabla 12. Tiempos de retención de los ácidos grasos contenidos en la muestra patrón y en diferentes sustratos.	28
Tabla 13. Tiempos de retención obtenidos para AG's contenidos en la mezcla patrón y los sustratos.	30

Tabla 14. Ecuaciones obtenidas de la curva de calibración para los patrones de AG's.	30
Tabla 15. Actividades hidrolíticas de los preparados comerciales de lipasas a 40°C.	31
Tabla 16. Composición (%) en ácidos grasos de la estearina de palma y la mezcla de ácidos grasos.	33
Tabla 17. Composición (%) en acilglicéridos de la estearina de palma.	34
Tabla 18. Rendimientos, selectividades y conversión del sistema glicerol – estearina de palma.	36
Tabla 19. Rendimiento, conversión y selectividad en el sistema glicerol – ácidos grasos.	41
Tabla 20. Composición en acilgliceroles de las muestras con poliéster de glicerol y goma arábica en la reacción: estearina – glicerol.	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras de MG y DG	4
Figura 2. Reacciones para la obtención de mono y diglicéridos.	5
Figura 3. Cromatógrama de los acilgliceridos del aceite de palma.	25
Figura 4. Perfil cromatográfico de la mezcla de ácidos grasos como metil ésteres.	28
Figura 5. Perfil cromatográfico de la mezcla de los acilgliceroles de la estearina de palma.	29
Figura 6. Actividades hidrolíticas de las lipasas: <i>Candida rugosa</i> , <i>Aspergillus Níger</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Thermomyces langinosus</i> a 40°C.	32
Figura 7. Índice de acidez (%) de las lipasas comerciales; sistemas glicerol –estearina.	35
Figura 8. Composición (%) en acilgliceroles de los productos interesterificados por acción de las lipasas comerciales en el sistema glicerol - estearina de palma (t= 4horas)	37
Figura 9. perfil cromatografico para la muestra catalizada por la Lipasa de <i>Mucor miehei</i> .	37
Figura 10. Rendimiento (%) de los glicéridos parciales en la evaluación de lipasas Comerciales.	39
Figura 11. Índices de acidez (%) de las lipasas comerciales; sistemas glicerol - mezcla de ácidos grasos.	40
Figura 12. Composición (%) en acilgliceroles de los productos interesterificados por acción de las lipasas comerciales en los sistemas glicerol - mezcla ácidos grasos.	41

Figura 13. Rendimiento (%) de los glicéridos parciales en la evaluación de lipasas Comerciales con los sistemas glicerol mezcla de ácidos grasos.	42
Figura 14. Estructura del emulsificante poliéster de glicerol.	44
Figura 15. Perfil cromatográfico del sistema glicerol - estearina utilizando goma arábica y lipasa de <i>Mucor miehei</i> .	45
Figura 16. Perfil cromatográfico del sistema glicerol - estearina Utilizando poliéster de glicerol y lipasa de <i>Mucor miehei</i> .	46
Figura 17. Efecto del variable tiempo en la producción de glicéridos parciales en el sistema glicerol - estearina de palma utilizando Lipozyme Mm.	48
Figura 18. Efecto del variable tiempo en la producción de glicéridos Parciales en el sistema glicerol - mezcla de ácidos grasos.	50
Figura 19. Perfil cromatográfico de la esterificación de la mezcla de ácidos grasos de palma al cabo de 175 minutos, empleando la lipasa de <i>Mucor miehei</i> .	50

ABREVIATURAS

AG's	Acilgliceridos
AGP	Ácidos grasos de palma
CICTA	Centro de Investigación en ciencia y Tecnología de Alimentos
C12:0	Acido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
CG	Cromatografía de Gases
DG	Diglicérido
EP	Estearina de palma
FA	Ácidos grasos
FFA	Ácidos grasos libres
FID	Detector de ionización en llama
GP	Glicéridos parciales
MG	Monoglicérido
MOG	Monooleilglicerol
MPG	Monopalmitoilglicerol
NTC	Norma técnica colombiana
OAT	Sodio (bis) (2- etilmetil) sulfocionato
pH	Potencial de hidrógeno
POP	2- Oleil-1,3-dipalmitoil glycerol
PP	Dipalmitina
PPL	1,2 – dipalmitoil -3- laureil glicerol

PPP	Tripalmitina
PPS	1,2 – dipalmitoil -3-estearoil glicerol
TG	Triglicerido
T _R	Tiempo de Retención

RESUMEN

TITULO:

EVALUACIÓN DE LIPASAS COMERCIALES EN LA PRODUCCIÓN DE GLICÉRIDOS PARCIALES A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEARINA DE PALMA.

AUTOR:

Villamizar A. Erwin; Martínez Fernando y Perea Aidé **

PALABRAS CLAVES:

Estearina de palma, mezcla de ácidos, grasos de palma, lipasas, glicerólisis, glicéridos parciales (monoglicéridos y diglicéridos)

La mezcla de ácidos grasos y la estearina se producen durante la refinación del aceite de palma, son compuestos que pueden servir como materia prima para la producción de glicéridos parciales (monoglicéridos y diglicéridos) que tienen amplia demanda como emulsificantes y estabilizantes en las industrias de cosméticos, alimenticia y farmacéutica.

La utilización de lipasas comerciales es una de las alternativas que presenta condiciones de reacción suaves en la producción de este tipo de productos. Por esta razón se evaluaron cuatro lipasas comerciales: Lipozyme de *Mucor miehei*, lipasa 8000 de *Aspergillus niger*, Lipasa XX de *Candida rugosa* y Lipozyme de *thermomyces langinosus* en la glicerólisis de la mezcla de ácidos grasos y la estearina de palma. La lipozyme de *Mucor miehei* presentó los mejores resultados en la producción de glicéridos parciales y utilizando con sustrato la mezcla de ácidos grasos.

Adicionalmente se determinó el efecto producido al adicionar emulsificantes tales como: poliéster de glicérol y goma arábiga en el sistema glicérol estearina de palma. Con este último emulsificante se logró mejorar en un 14% la producción de mono y diglicéridos. Además se estableció entre 3 y 4 horas los tiempos más favorables en la formación de los glicéridos parciales.

* Tabrajo de grado

** Facultad de ciencias, Programa de Química: Fernando Martínez y Aidé Perea

SUMMARY

TITLE¹:

EVALUATION OF COMMERCIAL LIPASES IN THE PRODUCTION OF PARTIAL GLYCERIDES FROM FATTY ACIDS AND PALM ESTEARINE.

AUTHOR:

Villamizar A, Erwin; Martínez Fernando y Perea Aidé^{**}

KEY WORDS:

Palm estearine, mixing of acids, palm fatty acids, lipases, glycerolysis, partial glycerides (monoglycerides and diglycerides)

Mixing of fatty acids and estearine are produced during the refining of palm oil, they are compounds that can be used as raw material for production of partial glycerides (monoglycerides and diglycerides) which have a large demand as emulsifiers and stabilizers in cosmetics, food and pharmaceutical industries.

Using commercial lipases is one of the alternatives that have conditions of soft reaction in the production of this kind of products. For that reason, four commercial lipases were evaluated: Lipozyme of *Mucor miehei*, lipase 8000 of *Asperillus Niger*, Lipase XXX from *Candida rugosa*, and Lipozyme from *thermomyces langinosus* in the glycerolysis in the mixing of fatty acids and palm estearine. Lipozyme from *Mucor miehei* showed the best results in production of partial glycerides and using fatty acids mixing with substrate.

Additionally, it was found the effect produced when we add emulsifiers as glycerol polyester and Arabic gum in glycerol estearine palm system. With this last emulsifier, an improvement of 14% in production of mono and diglycerides was obtained. Also, it was established between 3 or 4 hours, the most favourable time for formation of partial glycerides.

¹ Degree Project

^{**} Sciences Faculty, Chemistry Program, directors: Fernando Martínez and Aidé Perea.

INTRODUCCIÓN

La utilización de catalizadores enzimáticos se ha venido desarrollando como una alternativa a los catalizadores de origen químico en las reacciones de interesterificación tales como: acidólisis, transesterificación y glicerólisis de aceites y grasas de origen natural, con el fin de obtener productos químicamente modificados.

Las enzimas presentan la ventaja de catalizar las reacciones de interesterificación en condiciones moderadas de temperatura y presión. En cambio los catalizadores de origen químico requieren altas temperaturas por encima de 200°C y presiones elevadas que afectan la selectividad de la reacción.

El uso de mono y diglicéridos como emulsificantes no iónicos ha crecido enormemente en la industria de alimentos y la farmacia. Por ejemplo en la industria de alimentos son usados para modificar en un amplio rango puntos de fusión de algunos alimentos procesados así como agente texturizante en diferentes productos.

El presente trabajo de grado se enfocó en la evaluación de algunas lipasas comerciales en la esterificación y transesterificación del glicerol con una mezcla de ácidos grasos y estearina respectivamente para la producción de glicéridos parciales.

La mezcla de ácidos grasos y la estearina provienen del proceso de refinación del aceite de palma de la planta industrial de SACEITES S.A., se propone darle un uso diferente al actual, de alimento en la industria avícola en el caso de los ácidos grasos y como grasa saturada utilizada en la

industria de la panificación. Adicionalmente el glicerol puede ser valorizado mediante su transformación en glicéridos parciales ya que se produce en grandes cantidades como subproducto en otro tipo de reacciones como por ejemplo en la producción de esteres metílicos.

Con el fin de aprovechar las ventajas de selectividad ofrecida por las lipasas se ha propuesto las reacciones de esterificación enzimática como vía alterna para la producción de acilglicéridos parciales.

Durante la investigación se realizaron las siguientes actividades: 1). Caracterización de las materias primas y productos de acuerdo a la composición en ácidos grasos y acilglicéridos por la técnica de cromatografía de gases; 2). Evaluación y selección de la lipasa de mayor actividad en la producción de glicéridos parciales (MG Y DG); 3). El efecto de emulsificante: poliéster de glicerol y goma arábica en la producción de glicéridos 4). El efecto del tiempo de reacción en la formación de glicéridos parciales.

El trabajo se desarrollo en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA en colaboración con el Centro de Investigación en Catálisis, CICAT adscritos a la Universidad Industrial de Santander.

1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA

1.1 INTRODUCCIÓN

El exceso de producción de aceite de palma en el país, crea la necesidad de buscar nuevas alternativas del mismo y sus subproductos. En este caso la producción de mono (MG) y diglicéridos (DG) adquiere especial importancia.

Numerosos compuestos utilizados en la industria química pueden ser obtenidos de materias primas provenientes de los aceites vegetales. Las propiedades específicas de estos productos naturales (renovables, producción controlada etc.) son de gran interés para la industria.

Los MG y DG son utilizados ampliamente en las industrias: cosmética, alimenticia y farmacéutica como surfactantes o emulsificantes (Berger y col 1991; Macrae y col 1990 y Quesada 1997) y recientemente se ha comprobado la actividad antimicrobiana de estos compuestos. La FDA (departamento de drogas y alimentos) de los Estados Unidos recomienda la aplicación de estos compuestos como conservantes naturales de los alimentos. (Pereira y col 2004).

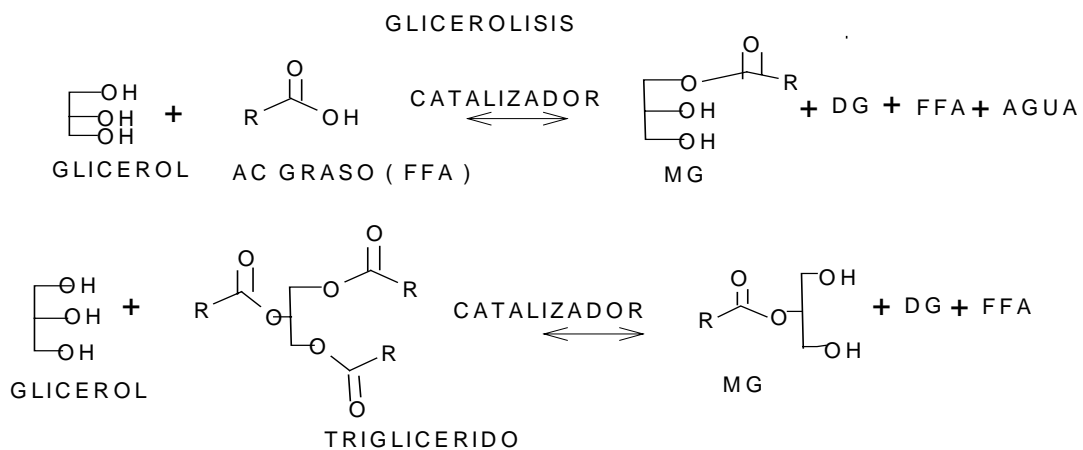
Estos productos se pueden obtener por una reacción de glicerólisis de los triglicéridos de aceites o grasas como la estearina de palma, hidrólisis de triglicéridos o esterificación directa de los ácidos grasos con el glicerol. Dichas reacciones se pueden realizar a altas temperaturas, (Potss y col 1968) o por interesterificación con catalizadores químicos, (Sontag 1982) y recientemente con catalizadores enzimáticos. (Zaher y col 1998 y Noureddine y col 1998). Actualmente se busca la obtención de mono y diglicéridos mediante el uso de tecnologías limpias, empleando catalizadores

conocido como glicerólisis, o el glicerol y los ácidos grasos llamado esterificación, tal como se indica en la figura 2.

En estas dos reacciones a diferencia de la hidrólisis directa de los triglicéridos de grasas o aceites se adiciona glicerol al medio de reacción.

En la esterificación de la mezcla de ácidos grasos, como en la glicerólisis de la estearina de palma se presentan mezclas de glicéridos parciales.

Figura 2. Reacciones para la obtención de mono y diglicéridos.



1.3 USO DE LAS LIPASAS PARA LA PREPARACIÓN DE GLICÉRIDOS PARCIALES.

En los procesos industriales generalmente los monoglicéridos son obtenidos por medio de catalizadores ácidos o básicos, conduciendo a una mezcla de mono, di y triglicéridos. En este proceso químico los glicéridos parciales deben purificarse mediante destilación molecular para alcanzar altos rendimientos (mayor al 90%). Generalmente el ácido sulfúrico y el ácido

paratoluensulfónico son usados como catalizadores homogéneos. Sin embargo estos catalizadores junto a los problemas ambientales creados, dan lugar a reacciones secundarias como la oxidación y la dimerización de los ácidos grasos y por otra parte pueden causar la polimerización del glicerol o su deshidratación en acroleína compuesto altamente tóxico. Estos inconvenientes se deberían superar utilizando catalizadores sólidos de carácter ácido, los cuales son reciclables y mejorarían el proceso. Se ha indicado el uso de una resina de intercambio catiónico para la esterificación directa del glicerol con el ácido oleico, obteniéndose un rendimiento en monoglicéridos hasta el 72%; pero este catalizador es menos activo que los ácidos mencionados (Abro y col 1999). En otros trabajos se ha realizado la reacción entre el glicerol y el ácido oleico en presencia de resinas aniónicas con altos rendimientos en monoglicéridos (Poilloux y col 1999).

Por otra parte numerosos ejemplos de catalizadores sólidos ácidos, tales como las zeolitas son mencionados en la literatura. Por ejemplo, Aracil y col (1997) describieron un proceso para la síntesis de monoésteres a partir de la esterificación del glicerol con ácidos grasos en presencia de zeolitas. Ellos indicaron un rendimiento en monoglicéridos cercano al 70%, cuando la reacción es realizada a baja presión y en el rango de temperaturas entre 100 y 190°C, aunque el efecto de la naturaleza de la zeolita no es evidenciado claramente. Además Bossaert y col (1999), indicaron que a 110°C ocurre la reacción espontánea entre el glicerol y el ácido laurico, y a medida que aumenta la temperatura es más significativa la obtención de glicéridos parciales. Recientemente Van y col (1998) modificaron un material mesoporoso con grupos sulfónicos, obteniendo materiales más activos que las zeolitas en la esterificación del Desorbitol con el ácido laurico logrando un rendimiento en la formación de monoglicéridos del 52%.

Otro tipo de catalizadores menos usados han sido los catalizadores sólidos básicos; hidróxidos y carbonatos así como las sales alcalinas de ácidos grasos, aunque estas últimas son menos eficientes (Lock y col 1985). Algunos trabajos han realizado la esterificación directa del glicerol con ácidos grasos en presencia de catalizadores sólidos básicos como MgO y ZnO (Povilloux y col 2000). Ellos demostraron que la velocidad de esterificación entre el glicerol y el ácido esteárico fue muy dependiente tanto de la naturaleza del catalizador así como de la solubilidad de los reactivos. Sin embargo, el inconveniente principal de los catalizadores químicos ha sido las condiciones de alta temperatura para realizar la reacción, conduciendo a la presencia de reacciones secundarias, cuyo efecto es la reducción en la producción de glicéridos parciales.

En los últimos años las investigaciones de la glicerólisis de aceites y grasas para la obtención de glicéridos parciales utilizando lipasas se ha incrementado. Las lipasas son enzimas que se clasifican dentro de las hidrolasas. Son esterasas que abundan en las semillas oleaginosas, en la leche, en el páncreas, y en muchos hongos y bacterias. Su acción es hidrolizar los enlaces éster, y actúan en la interfase de los sistemas inmiscibles (Verger 1980); catalizan en ocasiones la glicerólisis de triglicéridos utilizando microemulsiones con bajo contenido de agua (Chang y Rhee 1990; Holmberg y col 1989).

Las lipasas son probablemente las enzimas más utilizadas, porque varias preparaciones de diferentes fuentes son disponibles comercialmente con un grado satisfactorio de pureza, pero también porque no necesitan cofactores para su actividad catalítica. El contenido de agua es importante para la actividad de la lipasa, el contenido óptimo de agua es un compromiso entre una hidrólisis mínima y una máxima actividad enzimática para la interesterificación. Por esta razón las lipasas se usan en solventes orgánicos

o sin ellos con un contenido de agua entre el 1-10% (Basheer 1995). Las lipasas pueden dividirse en dos categorías según su especificidad (Foglia. 1993; Ghazali 1995; Marangoni 1993):

- Lipasa 1,3- específica: solo puede promover el intercambio de ácidos grasos ubicados en las posiciones 1 y 3 de las moléculas de triacilglicéridos, dejando inmodificada la posición 2 (*Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *thermomyces langinosus*, etc.).
- Lipasas no específicas: actúan de manera aleatoria hidrolizando o esterificando cualquier posición en la molécula de glicerol donde se encuentran ubicados los ácidos grasos (*Cándida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, etc.)
- El empleo de lipasas presenta ventajas tales como: (1) son de origen natural y por lo tanto no deberían ser tóxicas (Pecnik y col 1992); (2) especificidad, no proporcionan efectos secundarias indeseables (Krishna y col 1999); (3) funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de ph; actúan a bajas concentraciones; (4) fácilmente se inactivan o de fácil separación del medio de reacción si son inmovilizadas. (Watanabe y col 2001).

La principal desventaja de las lipasas es su elevado costo comparado con los catalizadores químicos (Wu y col 1999). Sin embargo, esto puede compensarse al establecer procesos de flujo continuo que permitan usar durante un tiempo determinado la lipasa sin removerla, lo cual conlleva a la disminución de los costos del proceso. Actualmente su costo ha disminuido al soportar las enzimas en óxidos inorgánicos.

Ergan y col (1990) obtuvieron glicéridos parciales, MG y DG a partir de ácido oleico y glicerol utilizando lipasa de *Mucor miehei*. **Mcneill y Yamane (1991)** llevaron a cabo la glicerólisis del aceite de palma y el sebo de res experimentando con un grupo de lipasas de *Pseudomonas sp*, *Candida rugosa*, *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidium* y *Mucor miehei*. Encontraron una producción de monoglicéridos del 82% en la glicerólisis del sebo de res, catalizado por la lipasa de *Mucor miehei*, y del 30% utilizando como sustrato aceite de palma y *Pseudomonas cp*. En 1992 **Mcneill y Yamane** reportaron la obtención del 54,4% de monoestearoilglicérol (C18) y 28,8% de monopalmitoilglicérol (C16) a partir de sebo de res y aceite de colza respectivamente, utilizando como lipasa *Pseudomonas fluorescens*.

A partir de ácido esteárico y oleico en presencia de lipasa de *Mucor miehei* **Sing y col (1994)** obtuvieron mono y diglicéridos utilizando un surfactante aniónico (AOT), sodium bis (2- etilmetil) sulfocianato con el fin de formar una microemulsión entre los sustratos. Los porcentajes de conversión alcanzados para los ácidos esteárico y oleico fueron del 30 y 70 % respectivamente.

Por otra parte **Zaher y col (1998)** obtuvieron glicéridos parciales por glicerólisis del aceite de girasol utilizando lipasa de *Chromobacterium*, lipasa *pancreatica*, lipasa de *Rhizopus arrhizus* y lipasa *Liofilizada* del germen de trigo, reportando la lipasa de *Cromobacterium* como la de mayor actividad y la lipasa *Liofilizada* la menos activa. Mientras **Noureddini y col, (1998)** llevaron a cabo la glicerólisis del aceite de soya, ensayando con nueve tipos de lipasas, *Penicillium roqueforti*, *Pseudomonas sp*, *Mucor sp*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Rhizopus niveus* y *Candida rugosa* en las mismas condiciones de reacción.

La máxima producción en monoglicéridos se alcanzó con la lipasa *psuodomonas sp*. Con un rendimiento del 30%.

En las tablas 1 y 2 se resumen algunas de las condiciones de reacción usadas por algunos investigadores que utilizaron las lipasas como catalizadores en la reacción de glicerólisis. Las condiciones de reacción indicadas en la tabla 1 muestra una concordancia en la relación glicerol/aceite o glicerol/grasa correspondiente a la relación estequiométrica ideal 2:1 respectivamente. En los sistemas se utilizó la menor cantidad de agua posible con el fin de evitar el desplazamiento de la reacción hacia la hidrólisis; el contenido de agua en la reacción se toma como referencia el peso de glicerol utilizado en la reacción y no fue superior al 10% (McNeill y col 1991).

En la esterificación de ácidos grasos presentado en la tabla 2 no fue necesario la adición de agua, ya que esta se produce durante el transcurso de la reacción, siendo indispensable su eliminación por medio de tamices moleculares, presión reducida o simplemente por evaporación libre manteniendo el sistema abierto (Ergan y col 1990).

Tabla 1. Revisión de condiciones de reacción para la obtención de mono y diglicéridos con distintas grasas y aceites.

Condición de reacción	<i>Cándida rugosa</i>*	<i>Cándida rugosa</i>**	<i>Asperguillus niger</i>**	<i>Mucor miehei</i>*
Temperatura (°C)	42	40	40	42
Contenido de agua (%)	3.6	3.5	3.5	3.6
Glicerol / aceite	2:1	2:1	2:1	2:1
Cantidad de enzima	500 unid / g aceite	0.1 g enz/ 10 g aceite	0.1 g enz / 10 g aceite	500 unid/g. Aceite
Grasa y/o aceite	Sebo	Aceite de soja	Aceite de soja	Sebo
Tiempo de reacción (horas)	54	1 hora	1 hora	8 horas 4 días
Rendimiento (%)	Inactiva	10	10	82
Uso de solvente	No	No	No	No

Fuente: *McNeill y col 1991. **Nooreddini y col 1998

La temperatura de reacción es por lo general la temperatura de fusión de la grasa, y teniendo en cuenta la temperatura a la cual la enzima presenta la mayor actividad. La utilización de solventes orgánicos no son considerados por la mayoría de autores, argumentando una posible contaminación de los productos y un costo adicional en la obtención de estos (Selmi y col 1998).

Tabla 2. Revisión de condiciones de reacción para la obtención de monoglicéridos a partir de distintos ácidos grasos.

Lipasa	<i>Mucor miehei</i>*	<i>Mucor miehei</i>**	<i>Mucor miehei</i>***
Ácido graso (FFA)	oleico	caprílico	esteárico
Temperatura (°C)	60	60	60
contenido de agua (%)	-	-	-
glicerol/FFA (Molar)	1:1	1:1	1:1
Cantidad de lipasa (%)	4,5	8,0	7,6
Tiempo (horas)	4,0	6,0	1,0
solvente	-	-	-

Fuente: *Ergan y col., 1990. **Selmi y col., 1997. ***Selmi y col., 1998

1.4 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE PALMA EN COLOMBIA

En el país hay cuatro zonas extractoras de aceite (Zona Norte, Central, Oriental y Occidental) que involucran 15 departamentos. Las plantas de extracción generalmente están ubicadas en las mismas zonas de plantación, en las cuales se produce el aceite crudo de palma. Este aceite es posteriormente sometido a una purificación en las refinadoras de aceite en donde se produce la estearina durante el fraccionamiento del aceite y los ácidos grasos como subproducto de la refinación del mismo.

En la tabla 3 se indica la composición en ácidos grasos del aceite de palma y sus fracciones oleina y estearina. La composición promedio de la estearina de palma esta representada en 50.2% de ácido palmitico, 33.8% de ácido

oleico, 8.8% de ácido linoléico y 5.1% de ácido esteárico como los mas significativos.

Por su parte el índice de yodo se utiliza como indicativo de medición del grado de insaturación del aceite o grasa. Para la mezcla de ácidos grasos del aceite de palma no se encontraron reportes en la literatura consultada referente a su composición. Se tomo como base la descripción hecha por la empresa SACEITES SA.

Tabla 3. Composición (%) en ácidos grasos del aceite de palma y sus fracciones obtenidas por diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	• Aceite de palma (tratamiento)						▪ Aceite de palma
	BERNARDINI		ALFA - LAVAL		TRITIAUX		
	Oleína	Estearina	Oleína	Estearina	Oleína	Estearina	
12:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-
14:0	1.1	1.1	1.2	1.4	0.9	1.2	1.1
16:0	38.4	47.5	39.2	50.8	38.6	52.3	44.0
18:0	4.3	5.3	4.3	5.1	4.7	5.1	4.5
18:1	42.9	35.8	42.7	33.2	43.2	32.4	39.2
18:2	12.5	9.5	11.9	8.6	11.9	8.3	10.1
18:3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.4
20:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
I de yodo	58.1	45.0	58.7	43.6	57.5	41.5	53
Pto fusión	20.2	39.3	18.2	46.7	18.4	50.9	38

Fuente: *Berger, 1986. *Cornelius, 1977

De acuerdo con la tabla 4, la composición en triglicéridos del aceite de palma crudo y sus principales fracciones: estearina y oleina, muestra que los triglicéridos PPP y POP se encuentran en mayor proporción. En la estearina en cambio los triglicéridos PPL, POO y PPS están en menor proporción. La gran cantidad de los ácidos palmítico y oleico en la estearina de palma se debe reflejar en los productos que se desean obtener en los mono y diglicéridos.

Tabla 4. Composición (% mol) en triacilglicéridos del aceite de palma y sus Fracciones

TRIGLICERIDO	ACEITE DE PALMA		
	CRUDO	OLEINA %	ESTEARINA %
POL	9.1	7.4	2.7
PPL	7.9	7.8	5.7
OOO	3.7	3.1	1.0
POO	25.8	22.7	5.7
POP	31.6	39.0	21.9
PPP	7.3	2.2	46.9
SOO	1.2	1.4	0.4
POS	4.2	6.1	1.6
PPS	1.2	1.9	6.8

Fuente: Moreno y col., 2000

En la tabla 5 se indican algunas características fisicoquímicas de la mezcla de ácidos grasos obtenidos del proceso de refinación del aceite de palma. El porcentaje de acidez varía entre el 78 y el 88% como ácido palmítico, debido a que se encuentra en mayor cantidad.

En cambio el índice de yodo en la mezcla de ácidos grasos es muy bajo, luego la mezcla contiene una baja concentración de ácidos grasos insaturados.

De acuerdo con el alto contenido de ácido palmítico en esta mezcla se podrían formar una mezcla de glicéridos parciales principalmente de este ácido, que puede sustituir potencialmente otro tipo de mono y diglicéridos como el caso del monoestearato de glicerilo (monoestearoilglicerol) ampliamente utilizados en la industria cosmética y de alimentos.

Tabla 5. Descripción del producto, mezcla de ácidos grasos obtenidos del Aceite de Palma Africana.

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	MÉTODO
PORCENTAJE DE ACIDEZ, COMO ÁCIDO PALMITICO	78.0 - 88.0	NTC 218
PORCENTAJE DE HUMEDAD	0.10 - 0.20	NTC 287
ÍNDICE DE REFRACCIÓN (50 °C)	1.4465-1.4475	NTC 289
ÍNDICE DE YODO (HANUS)	53 - 58	NTC 283
PUNTO DE FUSIÓN °C	47 - 50	NTC 213
ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN (mg KOH/g PRODUCTO)	190 - 205	NTC 235
PORCENTAJE DE MATERIAL INSAPONIFICABLE	1.5 % Máx.	NTC 235

Fuente: Tomado de la descripción realizada por la empresa CI SANTANDEREANA DE ACEITES

1.5 USOS DE LA ESTEARINA Y LOS ÁCIDOS GRASOS DE PALMA

Las aplicaciones dadas a la estearina de palma es bastante amplia, principalmente en los sectores de la confitería y la panadería tales como: mejorador de la masa para el pan, como iniciador de la cristalización en la industria de la confitería. Las margarinas para torta presentan hasta un 50% de estearina de palma (Berger y col 1988). Actualmente se ha empleado en la glicerólisis de emulsificantes de uso industrial (Traitler y col 1985) y las grasas para hornear pueden estar constituidas por mezclas de aceite y estearina de palma (Berger y col 1987).

En cambio los ácidos grasos sin modificaciones químicas, como el ácido oleico, esteárico, palmítico y mirístico se utilizan como emulsificantes y humectantes en productos cosméticos y en cremas de afeitar (Ahmad 1995). Su mayor aplicación se encuentra en la producción de jabones sodicos y los llamados jabones metálicos que son sales de ácidos grasos diferentes a los de sodio, especialmente zinc y calcio (Kiffi y col 1996). En la fabricación de

velas los ácidos grasos aumentan la vida de quemado y garantizan menor goteo. Además la inclusión de grasa en forma de ácidos grasos en la dieta de pollos de engorde permite mejorar la ganancia de peso y produce huevos de mayor tamaño (Zumbado 1990). Por lo tanto resulta interesante buscar nuevas alternativas al uso de la estearina y la mezcla de ácidos grasos, una vía consiste en la preparación de mono y diglicéridos, los cuales presentan aplicaciones como emulsificantes no iónicos en las industrias de alimentos farmacia y cosmética.

1.6 APLICACIONES ACTUALES DE LOS GLICÉRIDOS PARCIALES

Ha cobrado gran importancia la utilización de ácidos grasos y estearina, en la obtención de monoglicéridos y diglicéridos productos ampliamente usados en la industria.

En la industria de alimentos cumplen funciones tales como: mantener estable las emulsiones de los productos cárnicos y lácteos, evitar el endurecimiento de la miga de pan, mejorar la aireación y el volumen de los pasteles, retardar la pérdida de grasa en el chocolate, aumentar la cremosidad en los helados y reducir la salpicadura de las grasas para freír, además son utilizados como emulsificantes en las industrias cosmética y farmacéutica (Aisa 2004). Recientemente se comprobó el potencial de la monolaurina (monolaurilglicerol) y de otros monoglicéridos en inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y virus (Pereira y col 2004). El presente trabajo evaluó un conjunto de enzimas tipo lipasa, para seleccionar aquella que permitiera obtener un alto rendimiento de MG y DG a partir de una mezcla de ácidos grasos obtenidos del proceso de industrialización de la palma africana y de la estearina, fracción de alto contenido de ácidos grasos saturados del aceite de palma.

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES

La estearina de palma (EP) y los ácidos grasos de palma (AGP) fueron donados por la empresa Santandereana de Aceites -SACEITES S.A. - , junto con las mezclas comerciales de monoglicéridos de Dimodan (DANISCO). El n-hexano, la acetona y el etanol grado analítico fueron obtenidos de Merck. Los preparados comerciales de enzimas empleadas en este estudio fueron adquiridas a PROENZYMAS Ltda. Representante de NOVO NORDISK, todas los preparados comerciales fueron usados como se recibieron, sin purificación adicional.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Evaluación de Lipasas Comerciales. En tubos de reacción de 50 mL provistos de tapa se mezclaron los sustratos estearina de palma y glicerol con una relación molar 1:2, de igual manera se mezclaron los ácidos grasos y el glicerol, pero con una relación molar de 1:1. Al sistema formado por la mezcla estearina/glicerol y lipasa se adiciono un 10% de agua con respecto al peso del glicerol.

Por su parte el sistema ácidos grasos/glicerol no se adiciono agua. Una vez fundidos los sustratos alrededor de 55°C se agregan las respectivas lipasas comerciales: *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, y *Thermomyces langinosus*, en una cantidad correspondiente al 2.5 % de acuerdo al peso de los sustratos. Se llevaron a reacción por espacio de cuatro horas en un baño termostatado y con agitación orbital (Vibramax 100

Heidolph), las demás condiciones de reacción para cada sistema se presentan en las tablas 6 y 7. Finalizada la reacción las muestras son centrifugadas a 1200 rpm para separar las lipasas usando papel Whatman N° 4, a excepción de la reacción catalizada por la lipasa del *Candida rugosa*, enzima no inmovilizada, se inactiva por un choque térmico a 100 °C por 5 minutos. A cada muestra se le agregó 10 mL de la mezcla acetona-etanol y se procedió a neutralizarlas con NaOH (0.055 N) utilizando como indicador fenoftaleína, con el fin de determinar el grado de hidrólisis con base en el volumen de NaOH requerido.

Una vez neutralizadas las mezclas fueron transferidas a tubos de centrifuga agregándoles 12 mL de n-hexano para separar los ácidos grasos de los acilgliceroles, las fracciones superiores se trasladaron a balones para grasa de 250 mL con el fin de recuperar el solvente (n-hexano) en un evaporador a 60 °C el producto libre de solvente se colocó en un desecador por 12 horas. La composición en ácidos grasos y triacilgliceroles de los sustratos y productos se determinó por cromatografía de gases, transformando los ácidos en sus correspondientes metil ésteres. Para las condiciones de reacción se tuvo en cuenta condiciones de reacción semejantes encontradas en la literatura y de acuerdo con los sustratos de interés.

Tabla 6. Condiciones de reacción para el sistema estearina/glicerol

NOMBRE	Lipasa (g)	estearina (g)	Glicerol (g)	Agua (ml)	Temp (°C)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)
Candida rugosa	0,10	2,0	1,365	0,040	55,0	4,0	200
Aspergillus niger	0,10	2,0	1,365	0,040	55,0	4,0	200
Mucor miehei	0,10	2,0	1,365	0,040	55,0	4,0	200
Thermomyces laniginosus	0,10	2,0	1,365	0,040	55,0	4,0	200

Tabla 7. Condiciones de reacción para el sistema ácidos grasos/glicerol

NOMBRE	Lipasa (g)	Ácidos Grasos (g)	Glicerol (g)	Agua (ml)	Temp (°C)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)
Candida rugosa	0,065	2,0	0,653	0,0	55,0	4,0	200
Aspergillus niger	0,065	2,0	0,653	0,0	55,0	4,0	200
Mucor miehei	0,065	2,0	0,653	0,0	55,0	4,0	200
Thermomyces langinosus	0,065	2,0	0,653	0,0	55,0	4,0	200

2.2.2 Determinación de la Glicerólisis de la Estearina de Palma Utilizando Emulsificantes (Poliéster de Glicerol y Goma Arábica).

Con el fin de lograr una mayor solubilidad entre la estearina y el glicerol, se ensayo el uso de emulsificantes comerciales como el poliéster de glicerol y la goma arábica; en estudios realizados por algunos autores (CHANG y RHEE 1990 y HOLMBERG y col. 1989) utilizan este tipo de sustancias (microemulsiones), para lograr una mayor área de contacto de los sustratos que repercute en este caso en la producción de glicéridos parciales.

Se emplearon las mismas condiciones de reacción mencionadas en la tabla 6, junto con la adición 0.033g de los emusificantes que corresponde a una cantidad equivalente al 1% del peso de los sustratos. En esta ensayo se empleó la lipasa seleccionada en el numeral 2.2.1.

2.2.3 Evolución de la Glicerólisis y Esterificación de la Mezcla de Ácidos Grasos y Estearina de Palma en Función del Tiempo.

Se llevo a cabo la glicerólisis de los sustratos a nivel preparativo, con el fin de determinar la producción de glicéridos parciales en los intervalos de tiempo correspondiente a 0, 10, 25, 45, 75, 115, 175 y 295 minutos.

Para el primer sistema se pesaron 100 g de estearina, 71.83 g de glicerol (relación molar 1:1) y 5.15 g de la lipasa seleccionada en el numeral 2.2.1 las demás condiciones de reacción son similares a las presentadas en la tabla 6.

Para el segundo sistema de reacción se pesaron 100 g de la mezcla de ácidos grasos, 36.22 g de glicerol (relación molar 1:1) y 4.10 g de lipasa. El contenido de agua, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y la agitación del sistema se presentan en la tabla 7.

Una vez obtenidos los productos de reacción de los numerales 2.2.2 y 2.2.3 se neutralizaron, para su posterior análisis por GC.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.1 Determinación del Grado de Hidrólisis. El volumen requerido de NaOH en la neutralización durante la glicerólisis permitió determinar el grado de hidrólisis (% FFA) alcanzado durante la reacción, el cual se expresa como % de ácido oleico, expresado en la ecuación 1.

$$\% \text{Hidrolisis} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{Peq.Acido - Oleico}}{W_{\text{muestra}}} * 100 \quad \text{EC. 1}$$

Donde:

V_{NaOH}: Volumen (L) de NaOH gastado

N_{NaOH}: Normalidad del NaOH

Peq: Peso equivalente del ácido oleico

W_{muestra}: Peso en gramos de muestra

2.3.2 Determinación de la Actividad Hidrolítica de las Lipasas. La actividad hidrolítica de las lipasas se evaluó usando la oleína de palma emulsificada como sustrato, de la siguiente manera: se tomaron 5 g de oleína de palma y se mezclaron con 95 mL de solución de cloruro de sodio (0.9% w/v, NaCl) y 5 g de goma arábica, agitando la mezcla fuertemente por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente.

La emulsión formada se uso inmediatamente (20 mL), se mezcló con 20 mL de una solución de cloruro de sodio al 0,9%. El pH se ajustó a 8.0 adicionando NaOH 0.02 N. Posteriormente se adicionaron 400 µL de solución de cada una de las lipasas (25 mg de lipasa / 1mL de solución de cloruro de sodio al 0.9%) y se incubó la mezcla de reacción a \pm 40 °C con agitación constante (150 rpm) en un recipiente plástico de 100 mL. Los ácidos grasos liberados fueron monitoreados continuamente por titulación con NaOH 0.002 N desde una bureta automática DOSIMAT, manteniendo constante el pH (Bloomer y col, 1990).

2.3.3 Metilación con Trifluoruro de Boro (BF₃) en Metanol. Se tomaron 50 mg de muestra (ácidos grasos o estearina) y 1.0 mL de metanol contenido en BF₃ (10-12 % P/V). Se adicionó a la mezcla anterior 1.0 mL de hexano y 2 mL de solución saturada de NaCl. Se agitó vigorosamente por espacio de 15 segundos, se separó la capa orgánica superior y posteriormente se lavó dicha capa con 2 mL de agua destilada por dos ocasiones; se adicionó sulfato de sodio (NaSO₄) anhidro con el fin de retirar el agua remanente. Se evaporó el solvente a 60°C en un Soxhlet, y se tomaron 10 mg de residuo, adicionándole 30µl de estándar interno (C13) y aforando con hexano a 1mL (10 mg/mL).

Se inyectó al cromatógrafo 1µl de la solución anterior. (AOCS Oficial Method Ce 2-66).

2.3.4 Análisis de Ácidos Grasos. El análisis de ácidos grasos se llevo a cabo con el fin de caracterizar los sustratos de partida (estearina y mezcla de ácidos grasos de aceite de palma).

Los ácidos grasos son convertidos en sus correspondientes metil ésteres empleando BF_3 como catalizador para su posterior análisis por cromatografía en todos los casos se empleo un cromatógrafo de gases Hewlett – Packard modelo 6890, equipado con un detector de ionización por llama (FID), un inyector Split/Splitless y una columna capilar DB-WAX con fase estacionaria de polietilenglicol (ver tabla 8).

La identificación de los ácidos grasos (metil ésteres) presentes en cada uno de los sustratos y productos de glicerólisis se realizo por comparación con los tiempos de retención de los patronos de referencia.

En la cuantificación de los ácidos grasos como metil ésteres por CG se realizaron curvas de calibración con patrones, los cuales se obtuvieron a partir de una mezcla estándar de metil ésteres de ácidos grasos y mediante las diluciones sucesivas de esta mezcla con éter de petróleo.

Se prepararon soluciones A, B, C, D, E, F en las concentraciones que se especifican en la tabla 9. A cada una de estas soluciones se les adiciono 30 μl de tridecano, como estándar interno.

Para calcular la concentración de los patrones y las muestras se utilizo el método de normalización de áreas (ecuación 2) de acuerdo a la norma NTC 5013 de 2002 (ICONTEC)

$$\% . AREA = \frac{AP}{\sum P} \times 100 \quad \text{EC.2}$$

Donde:

AP: área del pico de interés

$\sum P$: sumatoria del área de todos los picos

Tabla 8. Condiciones cromatográficas de reacción

EQUIPO	Hewlett – Packard, HP 6890 Series (GC SYSTEM)
COLUMNA	DBWAX (Polietilénico), Dimensiones: 30 m x 0.2 mm x 0.25 μ m Modo de flujo constante: 0.7 ml/min
GASES	Gas de arrastre en columna: Helio Gases del detector: Helio (makeup), hidrógeno y aire Todos los gases son AGAFANO de alta pureza (99.995%)
INYECTOR	Tipo: Split/Splitless (inyección manual) Relación de Split: 40:1 Temperatura: 220°C
DETECTOR	FID , Temperatura: 225°C Flujo de gas helio (makeup): 30 ml/min Flujo de gas aire: 350 ml/min Flujo de gas hidrógeno : 35 ml/min

Tabla 9. Concentración (mg/ml) de metil ésteres de los patrones de ácidos grasos.

Concentración componente (mg/ml)	% en la mezcla (peso)	Patrón A	Patrón B	Patrón C	Patrón D	Patrón E	Patrón F
Mezcla FAMES		1,12	2,24	4,48	8,96	13,44	17,92
Caprílico	7,982	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,430
Capricho	7,981	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,430
Láurico	8,178	0,092	0,183	0,366	0,733	1,099	1,465
Mirístico	7,985	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,431

Fuente: Castellanos y col 2003

Continuación Tabla 9. Concentración (mg/ml) de metil ésteres de los patrones de ácidos grasos.

Concentración componente (mg/ml)	% en la mezcla (peso)	Patrón A	Patrón B	Patrón C	Patrón D	Patrón E	Patrón F
Palmítico	10,979	0,123	0,246	0,492	0,984	1,476	1,967
Palmitoleico	4,99	0,056	0,112	0,224	0,447	0,671	0,894
Esteárico	7,983	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,431
Cis-9 oleico	4,993	0,056	0,112	0,224	0,447	0,671	0,895
Linoleico	4,991	0,056	0,112	0,224	0,447	0,671	0,894
Linolenico	4,998	0,056	0,112	0,224	0,448	0,672	0,896
Araquidico	7,989	0,089	0,179	0,358	0,716	1,074	1,432
Behenico	7,983	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,431
Erucico(cis-13)	4,988	0,056	0,112	0,223	0,447	0,670	0,894
Lignocericico	7,981	0,089	0,179	0,358	0,715	1,073	1,430
	100						
IS (TRIDECANO)		1,217	1,217	1,217	1,217	1,217	1,217
Total solo componentes(debe ser igual a la mezcla fames)		1,12	2,2	4,4	8,96	13,44	17,92

Fuente: Castellanos y col 2003

2.3.5 Análisis de Acílgliceridos por GC. Para determinar la composición en acílgliceridos de los sustratos y productos de reacción se llevo a cabo utilizando la mezcla comercial DIMODAN PO para identificar los monoglicéridos de monopalmitoilglicerol, monoestearoilglicerol y monooleilglicerol. Los diglicéridos y triglicéridos se identificaron por comparación de estos con una grasa base de aceite de palma y caracterizaciones de estas regiones realizadas por **Arango, (2001)** y **Moreno, (2001)**. En todos los casos la cuantificación se llevo a cabo por el método de normalización de áreas, siguiendo el método AOAC 986.19/1990 para triacílgliceroles.

En la tabla 10 se presenta la composición de la mezcla de monoglicéridos comerciales conocida como DIMODAN PO.

Tabla 10. Composición (%) de la mezcla de monoglicéridos DIMODAN PO

Nombre comercial	Mirístico (%)	Palmitico (%)	Estearico (%)	Oleico (%)	Linoleico (%)	Araquidonico (%)
DIMODAN PO	0.4	45.4	53.9	0.2	-	0.2

Fuente: Datos suministrados por el proveedor DANISCO

Se determino el rendimiento, selectividad y conversión; teniendo en cuenta los porcentajes en área obtenidos en los sistemas glicerol – estearina y glicerol – ácidos grasos.

$$R = \frac{A.GP}{A.EST} \cdot 100 \quad C = \frac{A.TGi - .ATGf}{ATGi} \cdot 100 \quad S = \frac{A.(MG.o.DG)}{AMG + .ADG} \cdot 100$$

A: (%) EN AREA

EST: ESTEARINA

GP: GLICÉRIDOS PARCIALES

C: CONVERSIÓN (%)

S: SELECTIVIDAD (%)

R: RENDIMIENTO (%)

A TG_i y A TG_f: ÁREAS DE LOS TRIGLICÉRIDOS INICIAL Y FINAL

RESPECTIVAMENTE

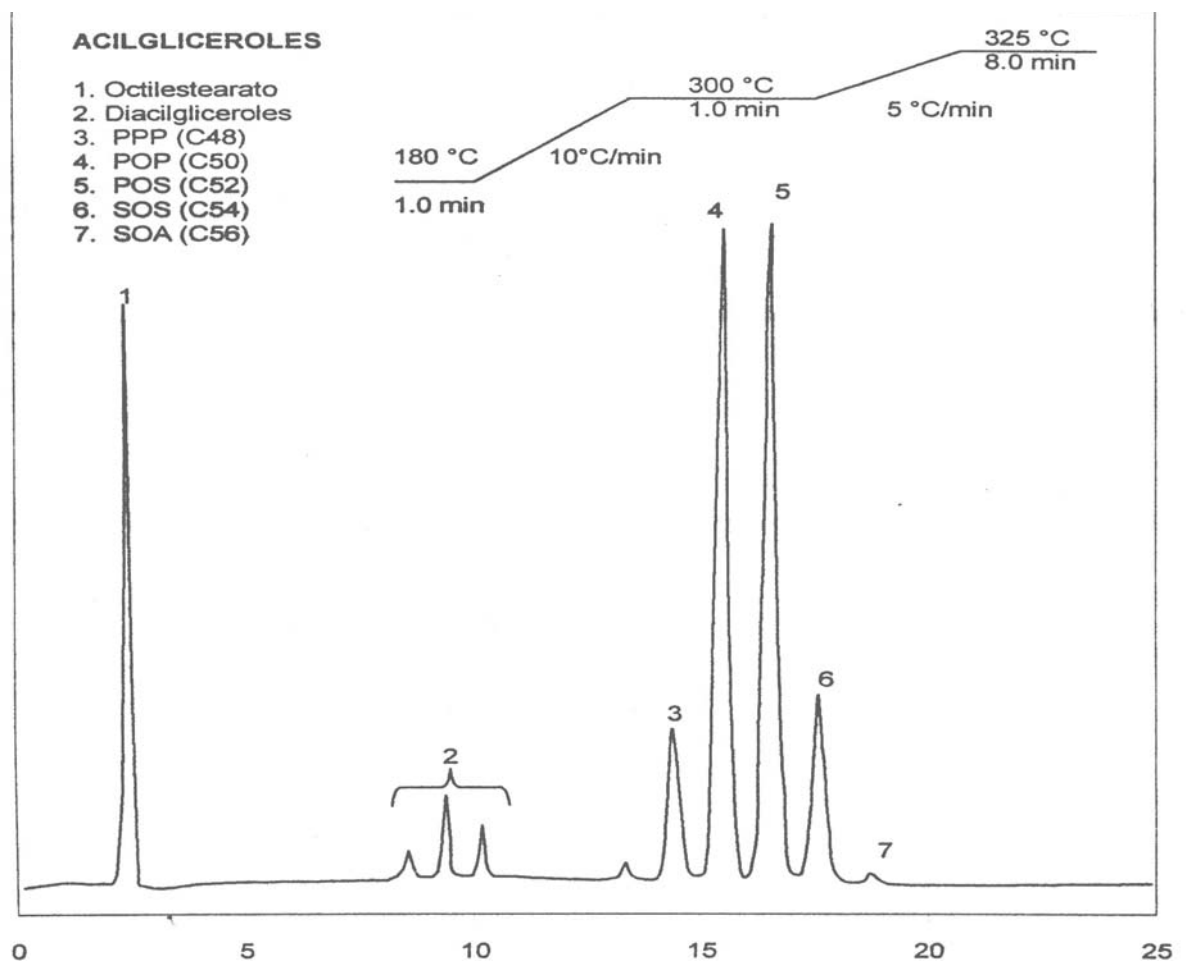
AMG y ADG: AREAS DE LOS MONO Y DIGLICÉRIDOS

RESPECTIVAMENTE.

Se tomo como base el 100% de los triglicéridos presentes en la estearina de palma así como el 100% de los ácidos grasos presentes en la mezcla comercial de ácidos grasos.

Uno de los cromatogramas que se tomo como base para identificar los diglicéridos y triglicéridos se presenta en la figura 3.

Figura 3. Cromatograma de los acilgliceridos del aceite de palma.



Fuente: Moreno y col., 2000

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con el fin de organizar los resultados de acuerdo a los objetivos propuestos, este capítulo se divide en las siguientes partes:

- En el primer lugar se describe los métodos empleados para la elución, identificación y cuantificación de los ácidos grasos (FA) y acilgliceroles (AG) presentes en los sustratos (mezcla de ácidos grasos y estearina de palma) junto con cada uno de los productos interesterificados obtenidos en los diferentes procesos enzimáticos, utilizando la Cromatografía de Gases (CG).
- En segundo instancia se presenta la actividad que poseen las lipasas para desligar los ácidos grasos de las moléculas de acilgliceroles, y la selección de la enzima con la cual se obtiene el mayor rendimiento en la producción de glicéridos parciales.

A continuación se evalúo el efecto del poliéster de glicerol y la goma arábica en la obtención de mono y diglicéridos a partir de estearina de palma, así como el efecto del tiempo en la obtención de los glicéridos parciales utilizando ambos sustratos y con la lipasa seleccionada previamente.

3.1 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.1.1 Separación, Identificación y Cuantificación de Ácidos Grasos Como Metil Ésteres (FAME) por GC. Para la separación y la cuantificación de los ácidos grasos por GC, se utilizo la norma NTC 5013 de 2002

(ICONTEC) para ésteres metílicos. Las condiciones de análisis seleccionadas se muestran en la figura 4. Bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución de los ácidos presentes en la mezcla, haciendo posible su identificación y cuantificación. Los tiempos de retención (t_R) de los patrones de metil ésteres y las ecuaciones correspondientes a las curvas de calibración de cada uno de ellos se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Ecuaciones para la cuantificación de los ácidos grasos por GC.

Ácido	t_R (min.) ^a	Ecuación	Factor de Correlación R^2
Láurico (C ₁₂)	7,46 ± 0,04	Y = 1,7222X	0,9993
Mirístico (C ₁₄)	9,20 ± 0,07	Y = 1,6270X	0,9990
Palmítico (C ₁₆)	10,90 ± 0,05	Y = 1,6606X	0,9989
Esteárico (C ₁₈)	12,52 ± 0,06	Y = 1,7867X	0,9991
Oleico (C _{18:1})	12,70 ± 0,03	Y = 1,7578X	0,9990
Linoleico (C _{18:2})	13,12 ± 0,05	Y = 1,9335X	0,9989
Linolenico (C _{18:3})	13,72 ± 0,07	Y = 2,1002X	0,9990

^a Promedio de 3 determinaciones ± la desviación estándar

^b X: relación de áreas (A_{PICO}/A_{PI}); Y: concentración del ácido en mg/ml

Para la cuantificación de los ácidos grasos presentes en los sustratos, se empleó el método de normalización de áreas, siguiendo la metodología descrita en el numeral 2.3.4.

El análisis de ácidos grasos en forma de metil ésteres permitió caracterizar por GC la mezcla de ácidos grasos, subproducto de la refinación del aceite de palma, del cual hay muy pocos reportes de su valoración.

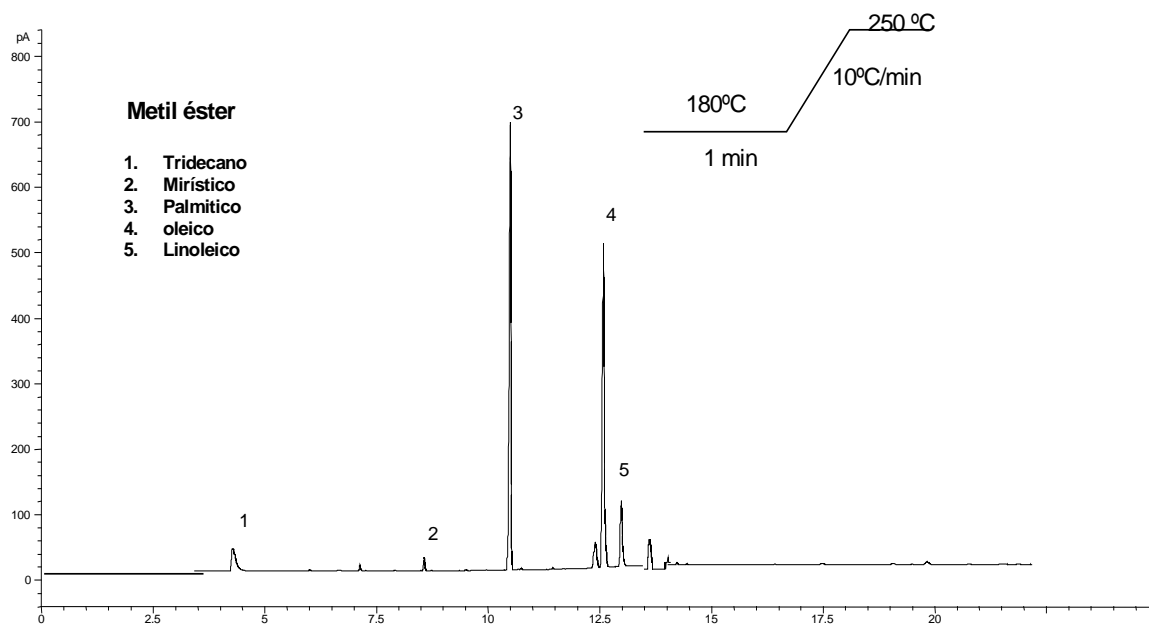
En la tabla 12 se presentan los tiempos de retención obtenidos para los patrones y los diferentes sustratos empleados en la investigación, los cuales sirven como base para la identificación de los ácidos grasos.

Tabla 12. Tiempos de retención de los ácidos grasos contenidos en la muestra patrón y en diferentes sustratos.

PATRÓN	TR ^a PATRÓN (min.)	TR SUSTRATO (min.)	
		ESTEARINA	ÁCIDOS GRASOS
Mirístico	9.20 ± 0.07	9.50	8.90
Palmitico	10.90 ± 0.06	10.45	10.61
Esteárico	12.52 ± 0.06	12.50	12.57
Oleico	12.70 ± 0.03	12.71	12.97
Linoleico	13.12 ± 0.05	13.07	13.55

a. los datos se presentan como el promedio de las determinaciones realizadas de cada uno de los tiempos de retención correspondiente a cada ácido graso ± la desviación estándar.
TR: Tiempo de retención

Figura 4. Perfil cromatográfico de la mezcla de ácidos grasos como metil ésteres.



Muestra: ácidos grasos

Gas de arrastre: helio 14.72 psi

Columna: MXT - GSTG DE RESTEK (5% fenilmetil silicona),

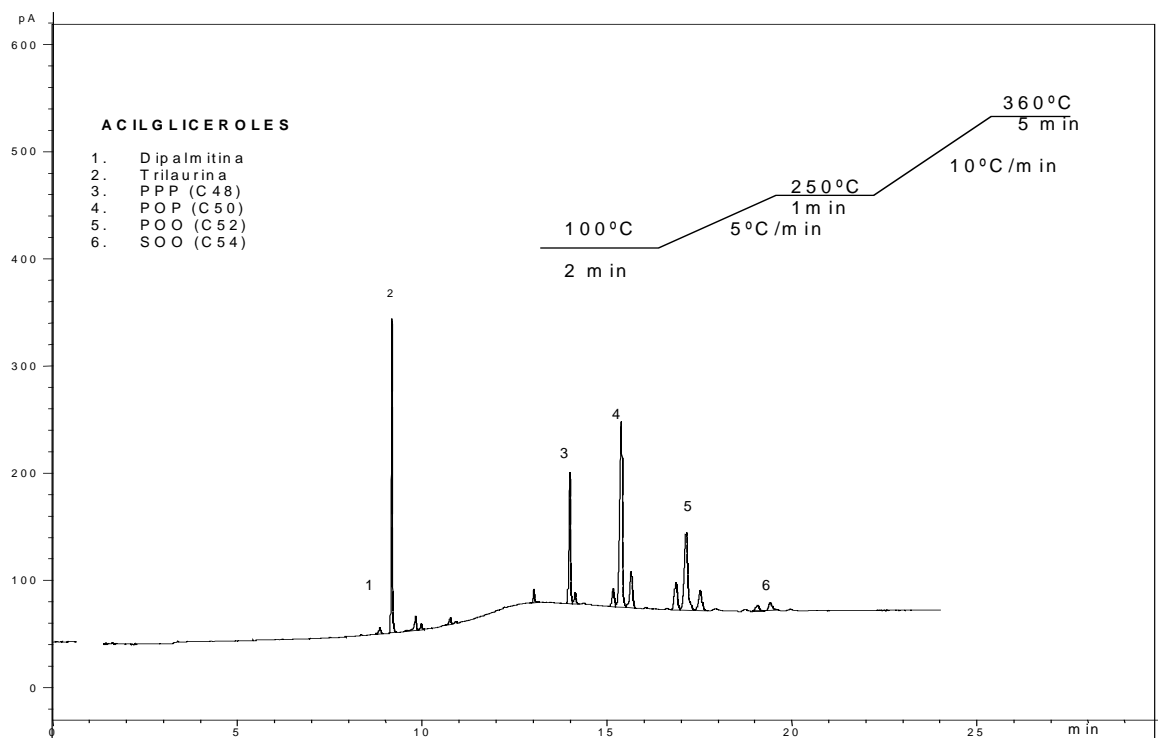
30mx25mmx0.1µm

Inyección: split(40:1), 0,5 µl, inyector 220°C

Detector: FID 225 °C

3.1.2 Identificación y Cuantificación de los Acilglicéridos por GC. Se empleó un método para la separación de acilglicéridos por GC adecuando las condiciones reportadas por GEERAERT (1987). En la figura 5 se presenta un cromatograma típico resultante del análisis de estos compuestos, señalándose las condiciones utilizadas.

Figura 5. Perfil cromatográfico de la mezcla de los acilglicéridos de la estearina de palma.



Muestra: acilglicéridos de la estearina de palma

Gas de arrastre: helio 14.72 psi

Columna: HP-5 (007-CW, Bonded Carbowax)), 25m x 0.25mm I.D. x 0.25 µm

Inyección: split(40:1), 0,5 µl, inyector 220°C

Detector: FID 280 °C

La identificación de los acilgliceroles se efectuó con base en la comparación de los tiempos de retención de los patrones y los tiempos de retención de las muestras analizadas, datos indicados en la tabla 13. En la tabla 14 se presenta las ecuaciones obtenidas para los patrones de acilgliceroles (AG's), utilizados para realizar los cálculos. La composición relativa en acilgliceroles de los sustratos y productos finales, se expreso como porcentaje de áreas, con el propósito de comparar los resultados con la literatura.

Tabla 13. Tiempos de retención obtenidos para AG's contenidos en la mezcla patrón y los sustratos.

AG's		TR ^a	TR SUSTRATO (min)	
Nº	Carbono	PATRÓN (min)	ESTEARINA	MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS
MPG	16	6.75 ± 0.05	-	-
MOG	18	7.48 ± 0.03	-	3.38
PP	32	8.85 ± 0.08	8,87	-
PO	34	-	9.82	-
PS	34	-	-	-
OO	36	-	10.75	-
PPP	48	-	13.98	-
POP	50	15.41 ± 0.02	15.38	-
POO	52	-	17.13	15.31
SOO	54	-	19.41	-
LLL ^b	36	9.18 ± 0.05	9.17	9.17

a. los datos se presentan como el promedio de tres determinaciones realizadas ± la desviación estándar. b. patrón interno, trilaurina.

Tabla 14. Ecuaciones obtenidas de la curva de calibración para los patrones de AG's.

Patrón	Nº CARBONOS	Ecuación ^a	FACTOR DE CORRELACIÓN
MPG	16	Y=4.6872.X	0.9918
MOG	18	Y=4.2852.X	0.9989
PP	32	Y=5.3217.X	0.9929
POP	50	Y=1.6281.X	0.9937

X: relación de áreas (A_{pico}/A_{PI}); Y: concentración de ácido en mg/ml

3.2 EVALUACIÓN DE PREPARADOS COMERCIALES DE LIPASAS

En la búsqueda de nuevos usos para el aceite de palma y sus fracciones, se evaluó el efecto catalítico de diferentes preparados comerciales de lipasas (cuatro inmovilizadas y una en solución la *Candida rugosa*) en la esterificación del glicerol con ácido grasos y la glicerólisis de la estearina de palma.

Las actividades hidrolíticas se determinó midiendo por titulación la cantidad de ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de la oleína de palma en los primeros 15 minutos mediante su titulación. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Actividades hidrolíticas de los preparados comerciales de lipasas a 40°C

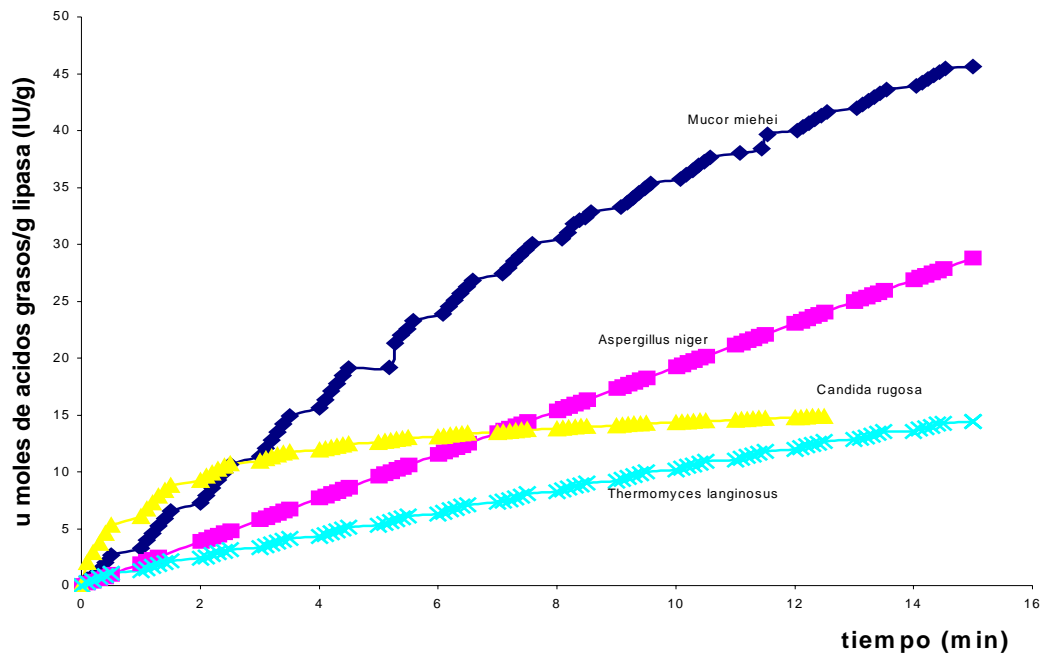
NOMBRE COMERCIAL	ORIGEN	ACTIVIDAD HIDROLÍTICA ^a (IU/g)
LIPASA XX	<i>Cándida rugosa</i>	0.750 ± 0.1
LIPASA 8000	<i>Aspergillus niger</i>	1.920 ± 0.08
LIPOZYME M IM	<i>Mucor miehei</i>	3.124 ± 0.13
LIPOZYME TI IM	<i>Thermomyces langinosus</i>	0.952 ± 0.2

a. Los datos se presentan como el promedio de tres determinaciones \pm las desviación estándar. La actividad hidrolítica se expresa en IU (Unidades Internacionales), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima comercial requerida para producir 1 μ mol de ácido graso libre por minuto (Mojovic, 1993)

De acuerdo con los resultados obtenidos se presento el siguiente orden de actividad hidrolítica: *Lipozyme IM* > lipozyme TI > lipasa 8000 > lipasa XX que se caracterizan por presentar una especificidad 1,3, la excepción es la lipasa XX que no es específica. El hecho que la enzima de *Candida rugosa* no este soportada, sea la causa por la cual presento la mas baja actividad hidrolítica (0.750 UI/g lipasa) es debido a una desnaturalización por efecto de la temperatura usada en el ensayo. En la figura 6 se observa que la actividad

hidrolítica de las lipasas es muy diferente, destacándose la actividad de la Lipozyme Mm frente a las otras. La razón de cambio o primera derivada de la ecuación de cada curva determina la actividad de la enzima.

Figura 6. Actividades hidrolíticas de las lipasas: *Candida rugosa*, *Aspergillus Níger*, *Mucor miehei*, *Thermomyces langinosus* a 40°C.



3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE PARTIDA Y PRODUCTOS DE REACCIÓN

3.3.1 Composición en Ácidos Grasos y Acilgliceridos de las Materias Primas. Tanto la estearina de palma como la mezcla de ácidos grasos usados como materia prima inicial presentan una consistencia sólida sugiriendo la presencia de ácidos grasos saturados.

La composición en ácidos grasos de la estearina de palma y la mezcla de ácidos grasos iniciales se presenta en la tabla 16.

Tabla 16. Composición (%) en ácidos grasos de la estearina de palma y la mezcla de ácidos grasos.

ÁCIDOS GRASOS	ESTEARINA	EXPERIMENTAL MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS	ESTEARINA^a
Mirístico	1.50	1.10	1.20
Palmítico	50.80	49.4	38.60
Estearico	3.70	4.10	4.70
Oleico	37.10	34.20	43.20
Linoleico	5.40	7.60	11.90
Total	98.50	96.40	99.6

Fuente: a. Tomado de JAOCS, vol. 54 (1977),

En el caso de la estearina de palma se observó un mayor contenido de ácido palmítico (50.2%) y un menor contenido de los ácidos oleico y linoleico, con respecto al análisis realizado por otros autores.

En cuanto a la composición en ácidos grasos del subproducto comercial conocido como mezcla de ácidos grasos se observa un alto contenido de los ácidos palmítico (49.45%), y oleico (34.3%). No se encontró ningún reporte en la literatura de la composición de la mezcla de ácidos grasos.

La presencia de ácido mirístico y estearico permanecen en el mismo orden en las dos muestras analizadas.

En la tabla 17 se presenta la composición porcentual de los acilglicéridos presentes en la estearina. Su composición en acilglicéridos de la estearina de palma se reporto principalmente de acuerdo al número de carbonos.

Tabla 17. Composición (%) en acilglicéridos de la estearina de palma.

AG's	NUMERO DE CARBONOS	COMPOSICIÓN (%)	
		EXPIRIMENTAL	LITERATURA ^a
MG	16	-	-
	18	-	-
	32	1.20	
DG	34	0.70	4.10
	36	2.30	
Total		4.20	
TG	48	21.00	19.90
	50	38.70	37.60
	52	30..20	28.70
		4.50	7.90
	Total	54	94.40

Fuente: a. Moreno 2001.

Los datos expresados están dados como porcentaje (%) en área. Abreviaturas: AG's acilglicéridos; MG, monoglicéridos; DG. Diglicéridos; TG, triglicéridos.

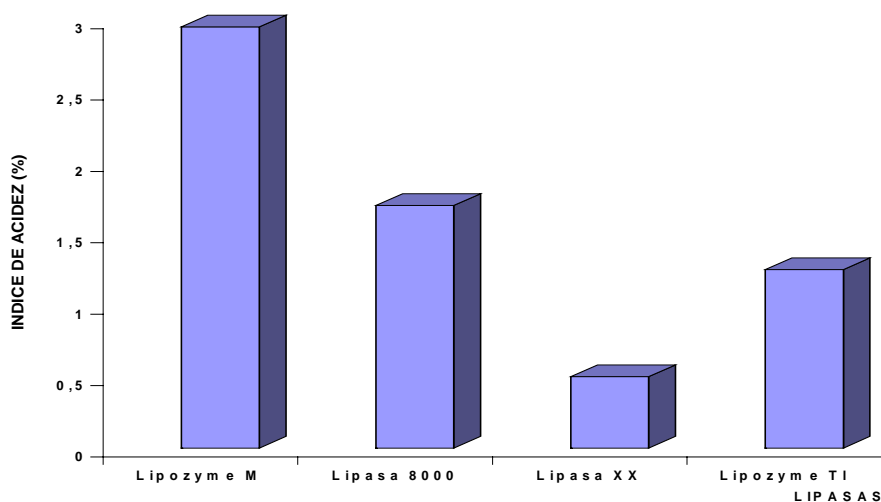
En la estearina de palma no se observó la presencia de monoacilglicéridos. La composición de los diacilglicéridos es muy similar al dato indicado en la literatura. Solo se observa una diferencia significativa en cuanto al contenido de C54.

3.3.2 Productos De La Reacción Enzimática.

- **Sistema Glicerol - Estearina de Palma.** En la figura 7 se indica el índice de acidez en función de la lipasa, valor que determinó al cabo de 4 horas de reacción entre el glicerol y la estearina de palma. La lipozyme Mm presentó el mayor índice de acidez seguido por la Lipozyme TI.

La lipasa de Lipozyme Mm presenta la mayor actividad hidrolítica con respecto a las demás lipasas alcanzando el 2.9% de ácidos grasos liberados durante este periodo de tiempo (ver figura 6). Este resultado se puede traducir en la posibilidad de formar glicéridos parciales (mono y diglicéridos) a partir del glicerol y la estearina, y esta en correspondencia con la actividad Hidrolítica observada (ver figura 6).

Figura 7. Índice de acidez (%) de las lipasas comerciales; sistemas glicerol – estearina.



El bajo índice de acidez para la Lipasa XX (*Candida rugosa*) (0.5%) puede estar asociada con su baja actividad hidrolítica que presentó la lipasa.

En la **figura 8** se indica la composición de los acilglicérols de los productos; Se presento una mayor formación de DG que de MG en todos los casos posiblemente por la transformación de Los MG a DG y un bajo contenido en ácidos grasos libres.

Se destaca los resultados presentados por la lipasa *mucor miehei* con un rendimiento en glicéridos parciales (GP) del 28.4%, representados en un

5.9% de MG y 22.5% de DG, conversión del 31.3% y selectividad del 20.8% en MG y 79.2% en DG.

La lipasa *thermomyces langinosus* presentó un rendimiento en GP del 15.2% representado en 4.7% en MG y 10.5% en DG, conversión del 10.1%. Por su parte la lipasa *candida rugosa* presento el rendimiento mas bajo en la formación de GP con el 4.3% y conversión del 5%.

Los trabajos presentados por Mcneill y col (1991) que representaron un 0.2% en la formación de DG y 0% en la de MG, con la lipasa *Candida rugosa* y Nouredini y Harmeier (1998) quienes reportaron un 5% en la formación de MG y un 2% en la de DG empleando la lipasa *Aspergillus Níger* y un 5% en MG y 7% en DG con la lipasa *Candida rugosa*, puede ser un indicio de la poca actividad de estas lipasas para catalizar este tipo de reacciones. Mientras la lipasa *Thermomyces langinosus* presento una actividad intermedia con una conversión del 15.5% en DG y 4.7% en MG, bajo las condiciones de reacción sin optimizar.

Los resultados de rendimiento, conversión y selectividad se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Rendimientos, selectividades y conversión del sistema glicerol – estearina de palma.

LIPASA	FFA (%)	MG (%)	DG (%)	TG (%)	RMG (%)	RDG (%)	RGP (%)	C (%)	S MG (%)	S DG (%)
LIPOZYME M	2,9	5,9	22,5	68,7	5,9	22,5	28,4	31,3	20,8	79,2
LIPASA 8000	1,7	2,1	10,4	84,9	2,1	10,4	12,5	15,1	16,8	83,2
LIPASA XX	0,5	0	4,3	95	0	4,3	4,3	5	0,0	100
LIPOZYME TI	1,2	4,7	10,5	89,9	4,7	10,5	15,2	10,1	30,9	69,1

RMG: RENDIMIENTO EN MNOGLICÉRIDOS (%)

RDG: RENDIMIENTO EN DIGLICÉRIDOS (%)

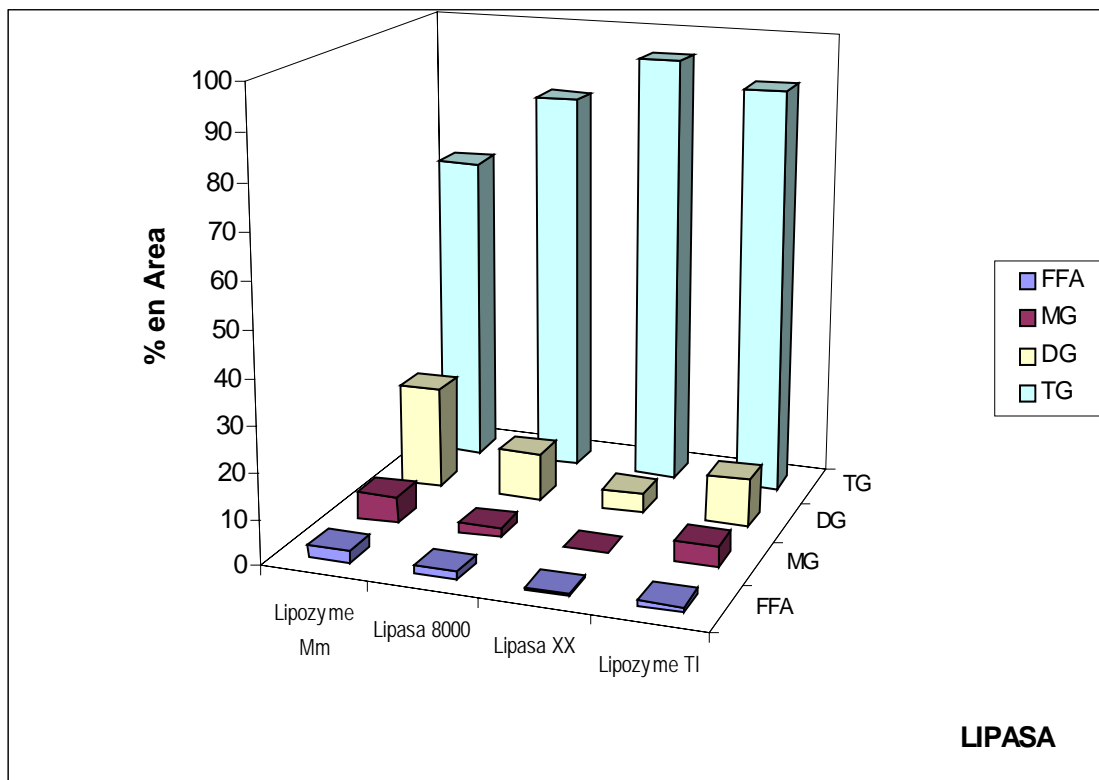
RGP: RENDIMIENTO EN GLICERIDOS PARCIALES (%)

C: CONVERSIÓN (%)

S MG Y DG: SELECTIVIDAD EN MONO Y DIGLICÉRIDOS (%)

Se presento una mayor formación de DG que de MG en todos los casos posiblemente por la transformación de Los MG a DG.

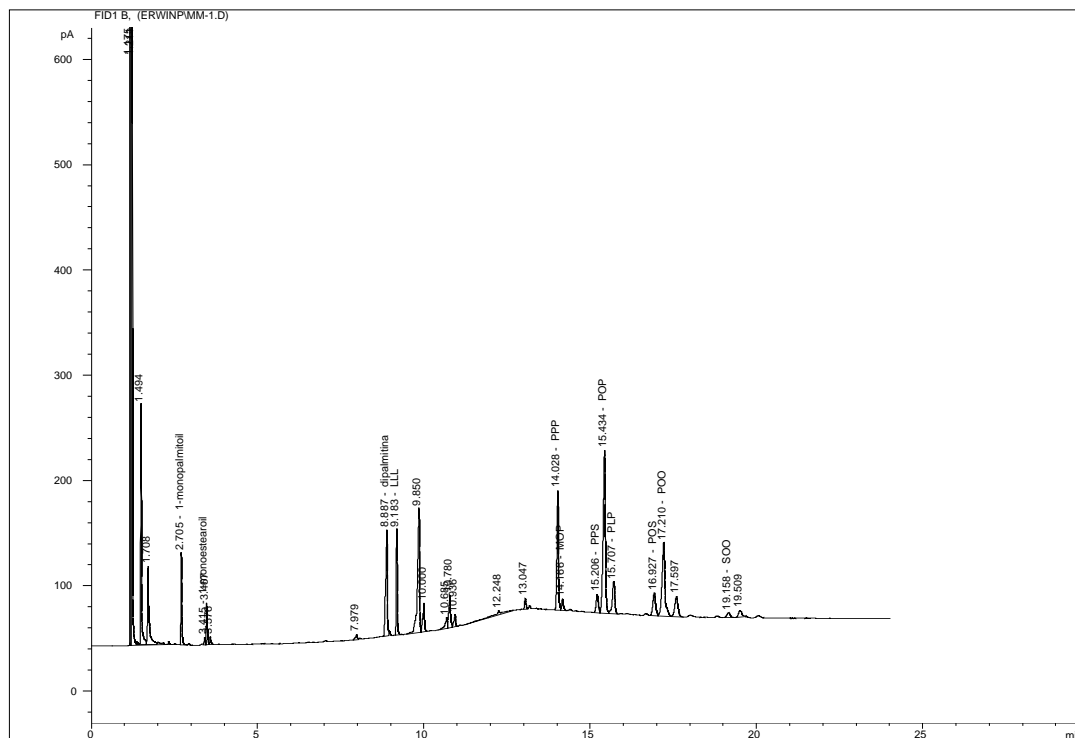
Figura 8. Composición (%) en acilgliceroles de los productos interesterificados por acción de las lipasas comerciales en el sistema glicerol - estearina de palma (t= 4horas)



a. los valores obtenidos son expresados en porcentajes de áreas relativas del total de los AG's presentes en la mezcla de reacción y corresponden al promedio de dos experimentos.

La figura 9 muestra el Cromatógrama correspondiente a la muestra catalizada por la lipasa *Mucor miehei*, donde se observa el pico correspondiente al monopalmitoilglicerol (C16), monooleilglicerol (C18:1), dipalmitoilglicerol (C32), C34 y C36.

Figura 9. perfil cromatografico para la muestra catalizada por la Lipasa de *Mucor miehei*.



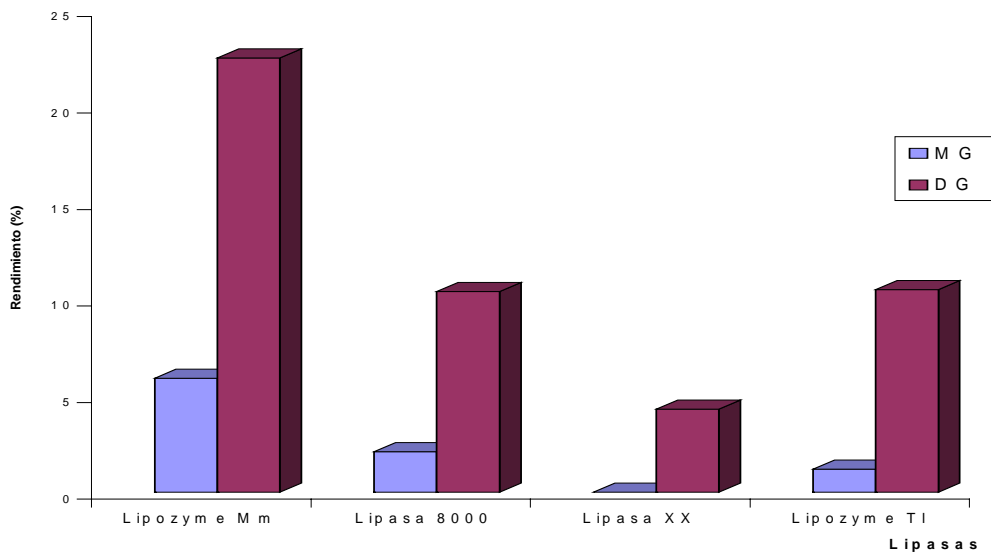
La producción de glicéridos parciales por parte de las demás lipasas fue menor, solo se alcanzo un valor significativo del 12.5% por parte de la lipasa de *Aspergillus niger*. Los rendimientos para las distintas lipasas se presentan en la figura 10.

En la figura 10 se muestra los resultados en términos del rendimiento, que se determino teniendo en cuenta el porcentaje en área de cada una de las fracciones (mono, di y triglicéridos) y la composición inicial de la estearina (94.1%) observándose que la lipasa de *Mucor miehei* presento rendimientos del 6.2% para monoglicéridos y del 23.9% para diglicéridos.

De acuerdo con los resultados observados se puede establecer una correlación directa entre la actividad hidrolítica de las enzimas y su accionar en la glicerólisis de la estearina de palma. En cuyo caso la lipasa de *Mucor miehei* presentó una fuerte actividad hidrolítica que se manifestó en una conversión apreciable de la estearina de palma. Sin embargo, la lipasa de

Termomyces langinosus quien presentó la mitad de la actividad hidrolítica con respecto a la *Mucor miehei*, presentó una baja conversión de la estearina.

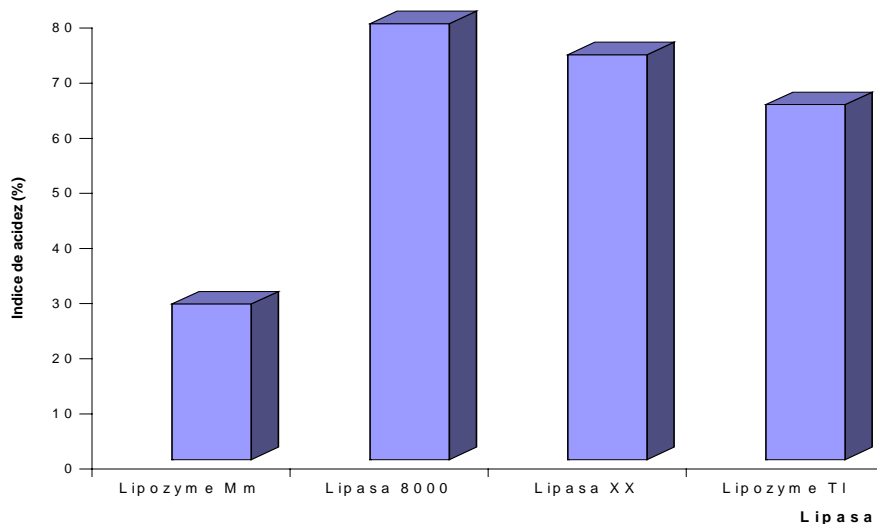
Figura 10. Rendimiento (%) de los glicéridos parciales en la evaluación de lipasas Comerciales.



- **Sistema Glicerol - Mezcla de Ácidos Grasos.** En la figura 11 se presenta los índices de acidez obtenidos para la esterificación del glicerol con la mezcla de ácidos grasos evaluados con cada una de las lipasas.

Teniendo en cuenta que se parte de una acidez inicial del muy alta (94.4%) los resultados obtenidos con la lipasa Lipozyme Mm (*Mucor miehei*) permite lograr una alta esterificación. Mientras que las demás reacciones catalizadas por las tres lipasas restantes presentaron índices de acidez por encima del 60% que se puede interpretar como una baja esterificación del glicerol por parte de la mezcla de ácidos iniciales.

Figura 11. Índices de acidez (%) de las lipasas comerciales; sistemas glicerol - mezcla de ácidos grasos.



En la **figura 12** se muestra la composición porcentual de los productos catalizados por cada lipasa. De acuerdo con estos resultados la lipasa de *Mucor miehei* presentó un rendimiento en glicéridos parciales (GP) del 35.6% representado en un 13.2% en MG y 22.4% en DG; conversión del 42.1%; y selectividades a MG y DG del 37.1 y 62.9% respectivamente.

Por su parte la reacción catalizada por la lipasa *Thermomyces langinosus* presentó los siguientes resultados: rendimiento en GP del 24.1%, representado en 13.9% en MG y 10.2% en DG; conversión del 28.3%; selectividad en MG y DG del 57.7 y 42.3%.

El mínimo rendimiento en GP lo presentó la reacción catalizada por la lipasa *Candida rugosa* con el 14.6%, aunque la selectividad a DG fue la mayor de todas las lipasas con el 66.4%. La reacción catalizada por la lipasa *Aspergillus niger* presentó un rendimiento del 16.6% para GP y selectividades altas del 51.8 y 48.2% para MG y DG.

Los valores de rendimiento, conversión y selectividad se presentan en la tabla 19.

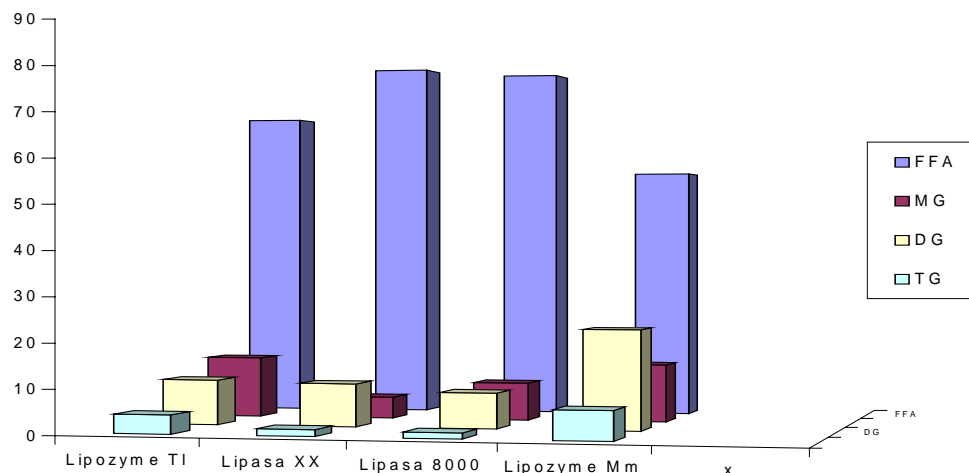
Tabla 19. Rendimiento, conversión y selectividad en el sistema glicerol – ácidos grasos.

LIPASA	FFA (%)	MG (%)	DG (%)	TG (%)	RMG (%)	RDG (%)	RGP (%)	C (%)	S MG (%)	S DG (%)
LIPOZYME M	57,9	13,2	22,4	6,5	13,2	22,4	35,6	42,1	37,1	62,9
LIPASA 8000	82,1	8,6	8	1,3	8,6	8	16,6	17,9	51,8	48,2
LIPASA XX	83,8	4,9	9,7	1,5	4,9	9,7	14,6	16,2	33,6	66,4
LIPOXYME TI	71,7	13,9	10,2	4,2	13,9	10,2	24,1	28,3	57,7	42,3

De acuerdo con algunos resultados presentados en la literatura utilizando esta misma enzima, Ergan y col (1990) obtuvieron un 3% de MG y un 50% de DG aproximadamente para el mismo tiempo de reacción (2.5 h). Por su parte Selmi y col (1997) obtuvieron una muy baja formación de MG (menos del 3%) y alrededor del 60% en DG transcurridas las primeras dos horas de reacción en la esterificación del ácido caprílico. Recientemente Pereira y col (2004) reportaron 20% en MG y 30% en DG en la glicerólisis de la trilaurina.

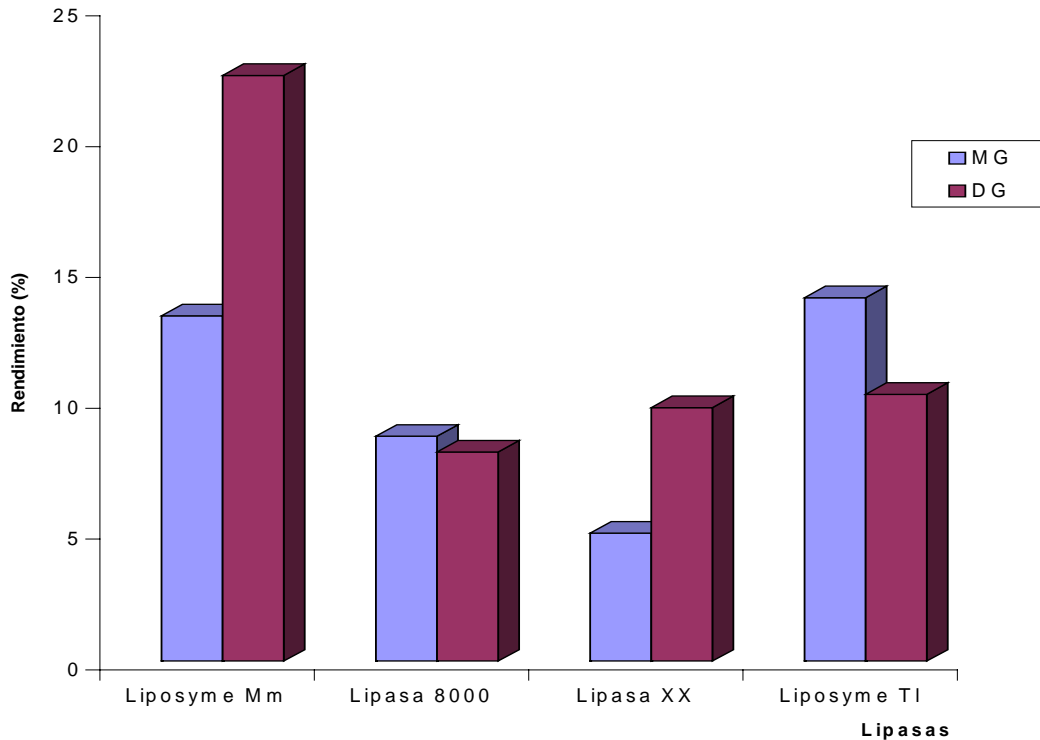
De la misma manera que en el sistema glicerol – estearina los ensayos catalizados por la lipasa 8000 y la lipasa XX presentaron las mas bajas conversiones, con el 17.9 y 16.2% respectivamente.

Figura 12. Composición (%) en acilgliceroles de los productos interesterificados por acción de las lipasas comerciales en los sistemas glicerol - mezcla ácidos grasos.



En la figura 13 se presentan los rendimientos para los glicéridos parciales obtenidos con la mezcla de ácidos grasos.

Figura 13. Rendimiento (%) de los glicéridos parciales en la evaluación de lipasas Comerciales con los sistemas glicerol mezcla de ácidos grasos.



De acuerdo con los resultados, Lipozyme Mm y TI presentaron rendimientos muy similares en la producción de monoglicéridos, (13.6 y 14.3%), y significativamente un mayor contenido de diglicéridos por parte de la Lipozyme Mm (23.1 y 10.5%).

El rendimiento de la reacción catalizada por la Lipasa 8000 fue muy cercano a las dos anteriores (8.8%) en monoglicéridos, mientras la Lipasa XX de *Candida rugosa* presento los rendimientos mas bajos en mono y diglicéridos con el 5.1 y 10.0% respectivamente.

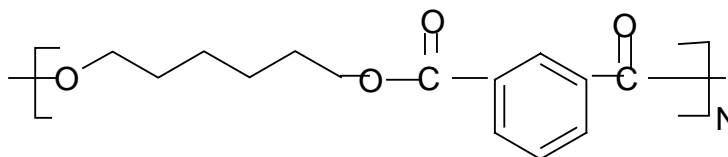
En la esterificación del glicerol con ácidos grasos se observó una mejor actividad enzimática, compara a la glicerólisis directa de la estearina de palma.

La lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme Mm) presentó los mejores resultados en la producción de glicéridos parciales (mono y diglicéridos), además se debe resaltar la actividad observada para la Lipozyme TI, ya que permitió obtener un rendimiento similar en MG pero con la mitad del rendimiento en DG, a pesar de que esta enzima presento una muy baja actividad hidrolítica comparada con la Lipozyme Mm. Sin embargo se seleccionó la Lipozyme Mm por su mayor actividad para evaluar el efecto de la presencia de un emulsificante.

3.3.3 Efecto de los Emulsificantes: Poliéster de Glicerol y Goma Arábica en la Glicerólisis de la Estearina de Palma. Debido a la escasa solubilidad de la estearina de palma y el glicerol, se ensayo para mejorar la solubilidad con dos emulsificantes comerciales: poliéster de glicerol y goma arábica, con el fin de aumentar el área de contacto de los sustratos y así observar su efecto en la producción de los glicéridos parciales.

La goma arábica esta formada por una cadena principal de D- galactosa, unidas en (1-3) y en algunos, sustituidos en el C-6 por ramificaciones de D- galactosa, arabinosa y acido D- galacturonico. Por su parte en la figura 14 se presenta la estructura del poliéster de glicerol, que esta formado por moléculas y grupos polares en su estructura, son estos grupos los que participan en las intensas atracciones que se genera en las cadenas poliméricas, manteniéndolas extendidas y evitando el deslizamiento de una sobre otra, las fuerzas intermoleculares son del tipo dipolo-dipolo debido a los grupos carbonilo.

Figura 14. Estructura del emulsificante poliéster de glicerol.



La mayor polaridad del poliéster de glicerol probablemente afecta la actividad de la lipasa retirando el agua de constitución de la enzima, y esta sea la causa de una menor formación de glicéridos parciales por parte de este emulsificante. Las condiciones de reacción fueron similares a las presentadas en la tabla 7. Los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia entre los dos emulsificantes ensayados. En el caso de la goma arábica se observó un incremento en la producción de monoglicéridos mientras que el contenido de diglicéridos no varió significativamente. Por otra parte los resultados obtenidos con el poliéster de glicerol mostró una disminución del 3.8% en monoglicéridos y 15.4% en diglicéridos con respecto al ensayo sin emulsificante. En la tabla 18 se indica la composición en acilglicerol obtenida con cada uno de los emulsificantes propuestos.

Tabla 20. Composición en acilglicerol de las muestras con poliéster de glicerol y goma arábica en la reacción: estearina - glicerol

MUESTRA	% ÁREA									
	FF A	C16	MG			DG			MG+ DG	TG
			C18	total	C32	C34	C36	total		
Poliéster de glicerol	6.9	1.2	0.9	2.1	2.9	5.7	1.4	10	12.1	81.0
Goma arábica	3.4	5.2	2.9	8.1	10.2	14.7	1.5	26.4	34.5	62.1
Sin emulsificante	2.9	4.5	1.4	5.9	8.9	12.7	0.9	22.5	28.4	68.7

Comparando los resultados la presencia de un emulsificante como la goma arábica posiblemente ayudó en la solubilidad de los sustratos estearina de palma - glicerol (sin desnaturalizar la lipasa) y en consecuencia aumentó el porcentaje de MG.

En la figura 15 y 16 se presentan los cromatogramas correspondientes a la evaluación de cada emulsificante.

Figura 15. Perfil cromatográfico del sistema glicerol - estearina utilizando goma arábica y lipasa de *Mucor miehei*.

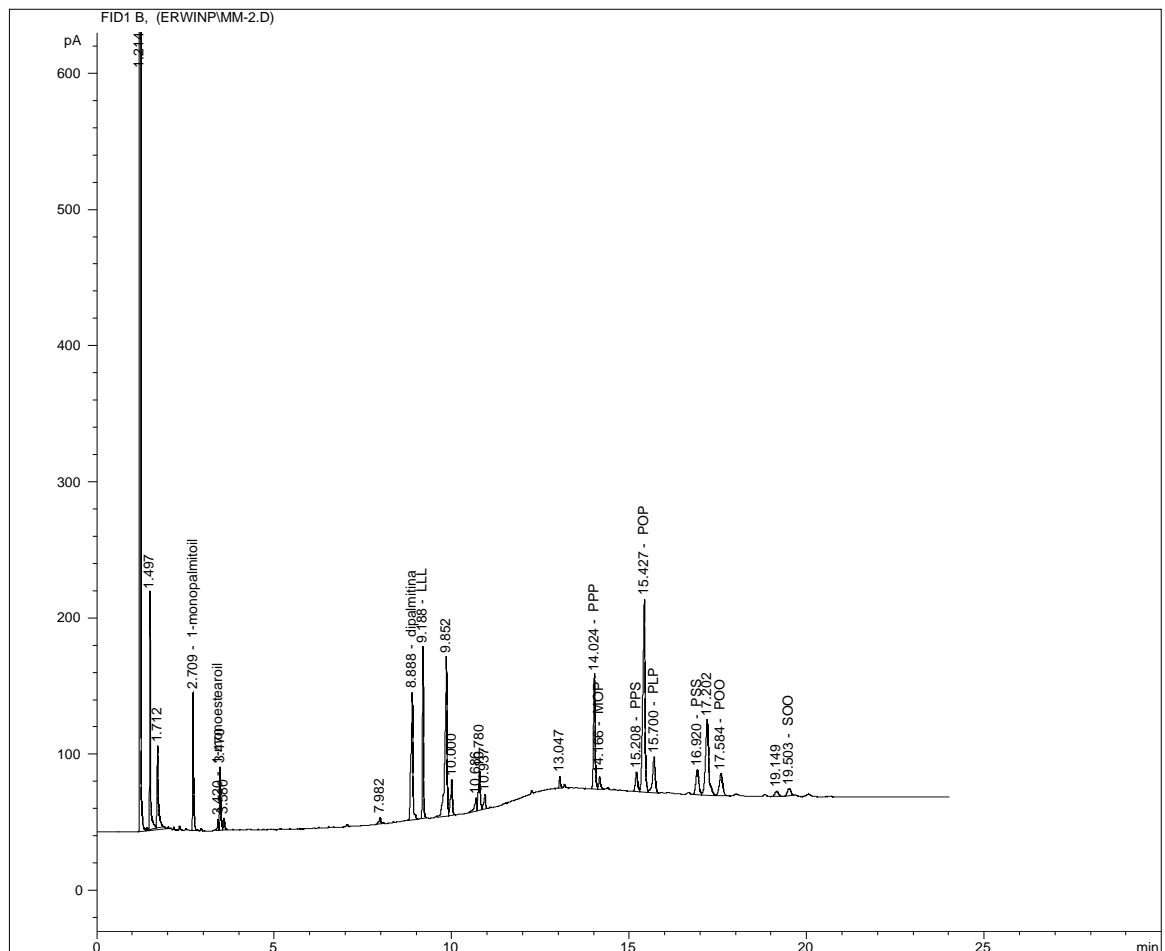
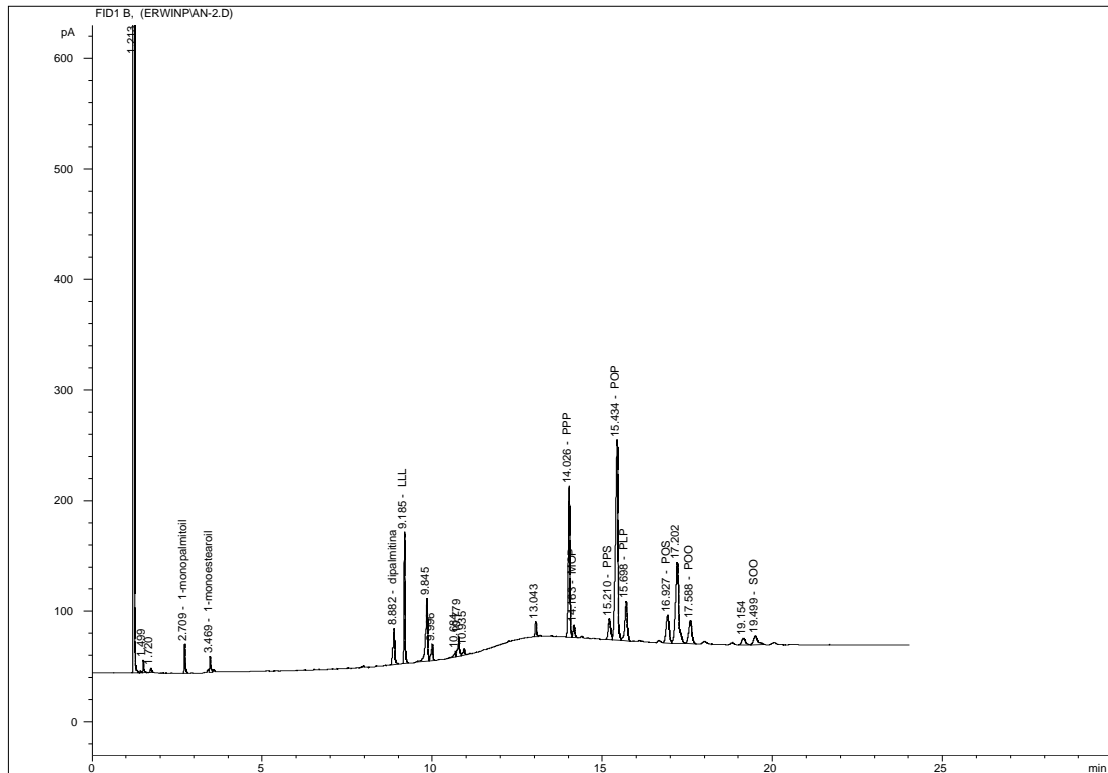


Figura 16. Perfil cromatográfico del sistema glicerol - estearina utilizando poliéster de glicerol y lipasa de *Mucor miehei*.



3.3.4 Efecto del Tiempo de Reacción en la Obtención de los Glicéridos Parciales. Con el fin de observar algún cambio de la actividad durante la reacción de los sistemas glicerol - estearina de palma y glicerol - mezcla de ácidos grasos se decidió determinar la composición en el medio de reacción para los siguientes intervalos de tiempo: 0; 10; 25; 45; 75; 115; 175; y 295 minutos. Las condiciones de reacción usadas son definidas en el numeral 2.2.3.

- **Resultados del Sistema Glicerol - Estearina de Palma.** En la figura 17 se muestra los resultados obtenidos en la producción de glicéridos parciales en función del tiempo, usando la lipasa Lipozyme (*Mucor miehei*). Durante los primeros 175 minutos el contenido de monoglicéridos

alcanzo su máximo valor (12.7%), y luego disminuyo paulatinamente al 6%. Igualmente se observa el mismo máximo para el contenido de diglicéridos (30.2%) el cual luego decae lentamente a 25.8%.

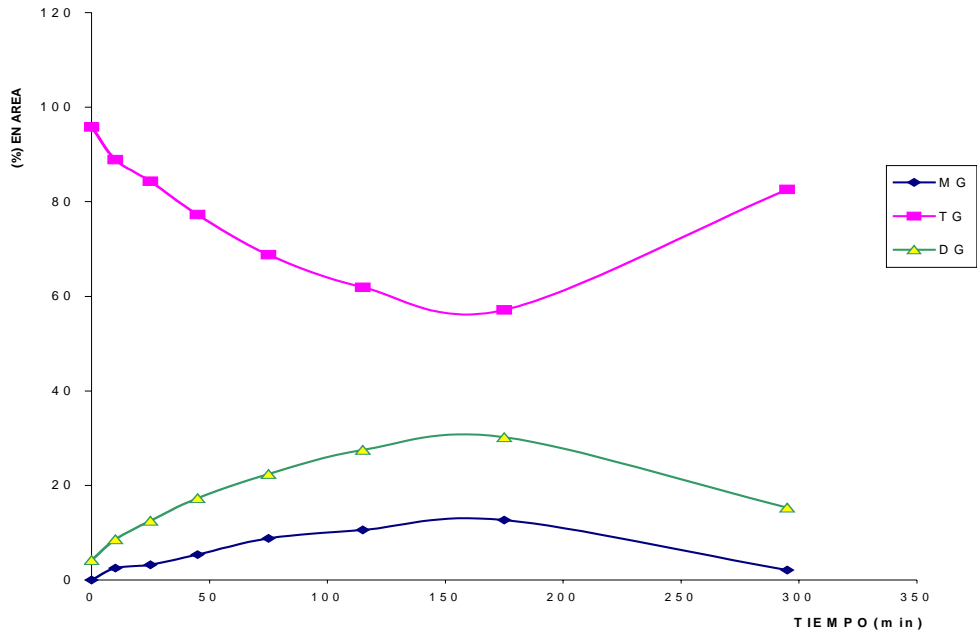
El perfil observado para los mono y diglicéridos se refleja de manera contraria en el contenido de triglicéridos para las primeras 3 horas disminuyo (57.1%) y luego aumento (68.2%) al finalizar la reacción.

Una posible explicación de la disminución de los mono y diglicéridos puede ser debida a una esterificación de los glicéridos parciales a triglicéridos, ya que los monoglicéridos formados pueden dar lugar a los diacilglicéridos y luego a los triacilglicéridos dada la complejidad de la transesterificación del glicerol.

Comparando las velocidades iniciales de las tres curvas de la figura 16 se estableció que la razón de cambio (dA/dt) que representa la velocidad inicial con la cual cambia la formación de GP en el tiempo, de acuerdo con la relación existente entre la concentración y el área se pudo observar que la curva de los triglicéridos fue la mayor (0.002 pA/ min) esto quiere decir que se produce una transformación mas rápida de los TG en los primeros 100 minutos de reacción comparada con la velocidad de transformación que presentan los DG y MG (0.0014 y 0.0008 pA/min) respectivamente.

Si embargo al sumar las velocidades de formación de MG y DG es equivalente a la velocidad de descomposición del TG. Esto podría sugerir que se forma más rápidamente el DG que el MG en las condiciones de reacción usadas

Figura 17. Efecto del variable tiempo en la producción de glicéridos parciales en el sistema glicerol - estearina de palma utilizando Lipozyme Mm.



Fuente: MG: monoglicéridos DG: Diglicéridos TG: Triglicéridos

- Resultados del Sistema Glicerol - Mezcla de Ácidos Grasos.** En la figura 18 se presenta la formación de los glicéridos en función del tiempo de reacción usando la lipasa Lipozyme Mm. Se observó que la máxima formación de glicéridos parciales fue de 49.3%, representado en 17.9% de monoglicéridos y 31.4% de diglicéridos. Al igual que en el sistema glicerol - estearina alcanzo el máximo de producción al cabo de 175 minutos de reacción. La pendiente de la curva de FFA (0.0024 pA/min) es mayor a la presentada por las otras tres fracciones (mono, di y triglicéridos) con 0.001 0.00016 y 0.0009 pA/min, lo cual indica que la transformación de la mezcla de ácidos grasos se lleva a cabo rápidamente en las primeras horas de reacción. La figura 19 muestra el perfil cromatográfico correspondiente a el tiempo (175min) donde se llevo a cabo la máxima formación de glicéridos parciales, se destaca los valores correspondientes a los acilglicerol: C16(9.3%), C18 (8.6%),

C32(11.7%), C34(15.9%), C36(3.8%) y los TG 7.3%, mientras los FFA presentan un mínimo (43.4%). El contenido de TG aumentó progresivamente en el tiempo, posiblemente por la transformación de los glicéridos parciales, tal como lo indican Ergan y col (1990) y Selmi y col (1997).

Esto indica que la esterificación del glicerol con los ácidos grasos ocurre y es posible bajo condiciones apropiadas y en un tiempo determinado alcanzando un máximo en la formación de los glicéridos parciales. Es importante tener en cuenta que hasta el momento no se han optimizado las variables de reacción con el fin de lograr una producción máxima de glicéridos parciales. Las reacciones de esterificación entre los polialcoholes y los ácidos grasos libres son, en esencia, la reacción inversa de hidrólisis del correspondiente glicérido. En consecuencia el equilibrio entre las reacciones directa e inversa es generalmente controlada por el contenido de agua en el medio de reacción Sing y col (1994) y Selmi y col (1997). Luego el contenido de agua en la glicerólisis o esterificación de la estearina o los ácidos grasos libres es una variable muy importante ya que puede desplazar el equilibrio de la reacción hacia la hidrólisis cuando el contenido de agua en el medio es muy elevado.

Comparando los resultados presentados en el numeral 3.3.2.2 y los presentados por autores tales como: Ergan y col (1990), donde indica la mayor formación de MG durante las primeras 4 horas de reacción y McNeill y col (1990) que presenta la formación de DG a los 3 horas mientras los MG se formaron un poco antes (alrededor de 2 horas). Se presenta una tendencia para la formación de los GP en las primeras horas de reacción.

Figura 18. Efecto del variable tiempo en la producción de glicéridos parciales en el sistema glicerol - mezcla de ácidos grasos.

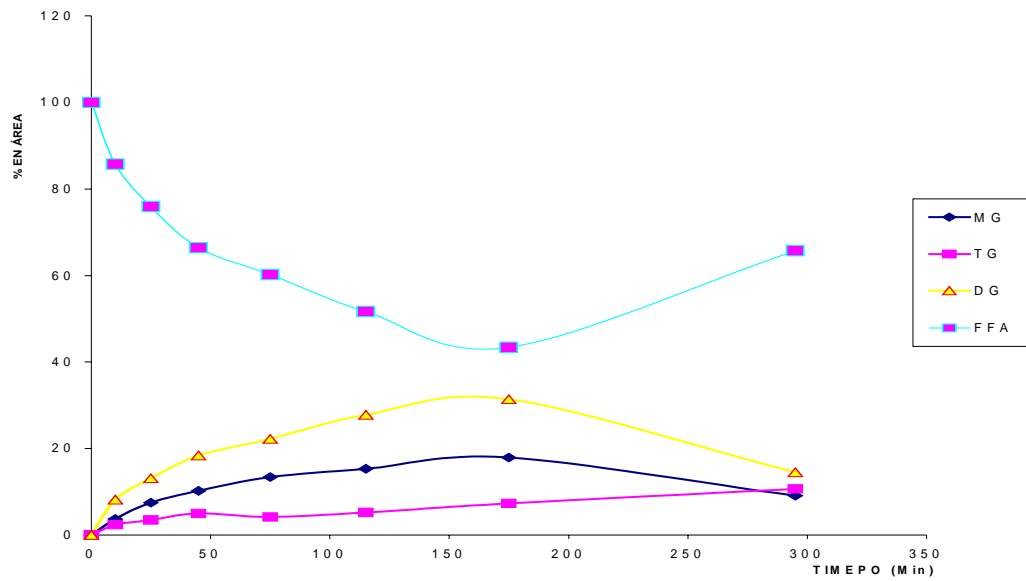
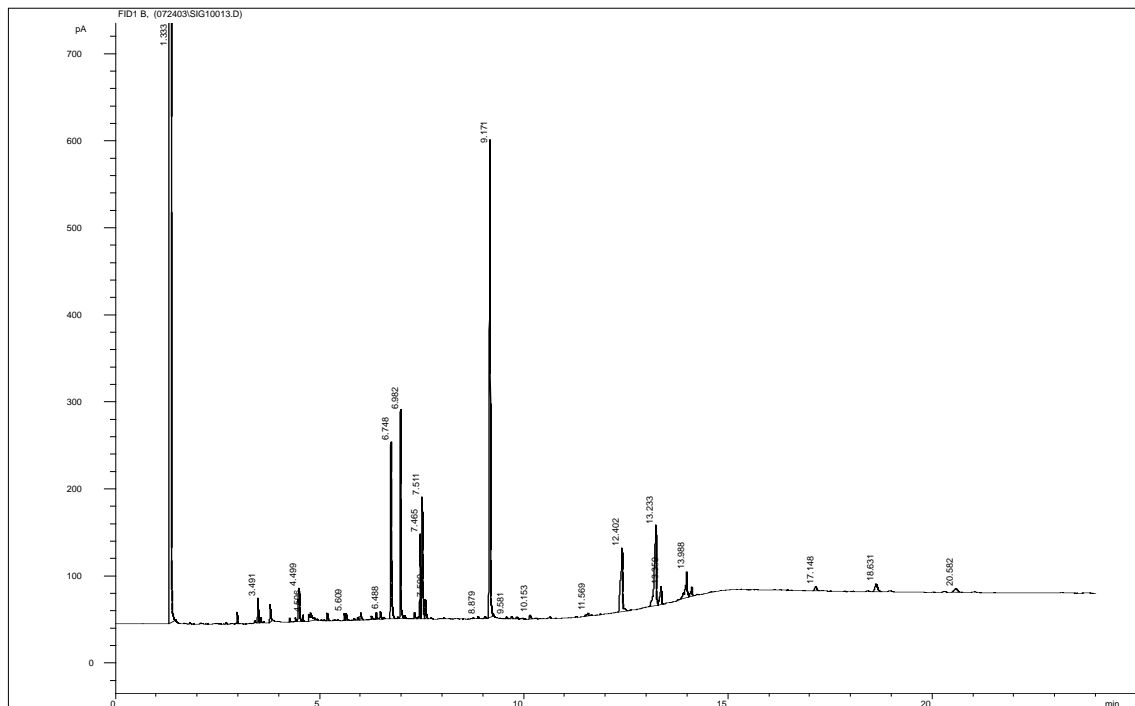


Figura 19. Perfil cromatográfico de la esterificación de la mezcla de ácidos grasos de palma al cabo de 175 minutos, empleando la lipasa de *Mucor miehei*.



CONCLUSIONES

Se observó una correlación directa entre la actividad enzimática y las reacciones de esterificación y glicerólisis de la mezcla de ácidos grasos y la estearina de palma. Se observó que la enzima comercial Lipozyme Mm (de *Mucor miehei*) presentó la mayor actividad catalítica durante las reacciones de esterificación y glicerólisis de la mezcla de ácidos grasos y la estearina de palma.

El uso de un emulsificante (goma arábiga) favoreció el aumento de los glicéridos en el sistema glicerol – estearina de palma, la producción de glicéridos parciales se incrementa en este caso en un 14%.

Durante la reacción de transformación enzimática del glicerol, se observó que la cantidad de MG y de la de DG es máxima para un determinado tiempo de reacción, entre 170 y 200 min. y luego se presentó una disminución de su concentración, puede ser debido a la transformación de los glicéridos parciales (MG y DG) en triglicéridos o también al incremento de los ácidos grasos libres con el tiempo.

Al comparar las reacciones de transesterificación y esterificación enzimática del glicerol, usando Lipozyme Mm, se observó mayor rendimiento en la formación de los MG y DG cuando se realizó la esterificación. Esto contempla la posibilidad de usar la mezcla de ácidos grasos, provenientes de la planta de SACEITES, como materia prima para la formación vía enzimática de glicéridos parciales, conduciendo a valorizar el uso del glicerol y los ácidos grasos, generados como productos secundarios durante el proceso de refinación de aceite de palma en su planta comercial.

RECOMENDACIONES

Para mejorar la producción de los glicéridos parciales con los ácidos grasos libres que presentaron la mejor respuesta en la formación de estos productos, se podría optimizar de acuerdo con la literatura y el trabajo realizado en esta investigación las condiciones mas influyentes tales como: relación entre sustratos, contenido de agua o contenido de lipasa en la reacción, utilizando para ello un diseño experimental.

BIBLIOGRAFÍA

ABRO, P.; NAMBAS AND WAKUSHIMA, Y. Catalysis by Acids and Bosis Surf Sci. Catal. Vol. 20. Elsevier, 1985.

AHMDAD, S. Non Food Uses of Palm Oil y Palm Kernel Oil. MPOPC. Kuala Lumpur 24p (Palm Oil Information Serias), 1995.

ARACIL, D.; ANNE, C. AND RENARD, G. Monoglyceride Sythesis by Heterogeneous Caalysis Using MCM-41 Type Silicas Functionalized With Amino Groups. J. Org. Chem, 1997.

ARANGO, L. y PEREA, A. Influencia de los Enzimas Lipasas Comeriales sobre las Características Fisicoquímicas del Aceite de Palma. Tesis de Grado. UIS. Bucaramanga: Colombia, 2001.

ATKINSON, PJ., ROBINSON, BH. AND HEENAN, AK. Structure and Stability of Microemulsion – based Organogels. J. Chem Soc. Faraday Trans, 1997.

BADUI, S. Química de los Alimentos. 3 ed. México: Alambra, 1996.

BASHEER, D., TWEDDELL, R., Y COLOMBIE, S. Water Activit y Control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. Biotechnology and Bioengineering, 1998.

BAUMANN, H., AND BIERMANN, M. Oleochemical Surfactants Today. Eleares (Malasia), 1994.

BERGER, K. Monoglycerides in food systems: current and future uses. Food Tenchnology, 1986.

BERGER, K.G. AND TIAN, Y.K. Palm Oil: The Margarine Potencial, Food Manuf Int., 1988.

BERGER, K.G. AND LAW, W.S. End Uses of Palm Oil. PORIM. Kuala Lumpur, Mlaysia, 1987.

BERGER, M. AND SCHNEIDER, M. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solventFat Sci Technol, 1991.

BIRNBAAUM, H. AND LEDERER, J. Process for Producing Monoglicerides of Fatty Acids.m 1963.

BLOOMER, S., ADLECREUTZ, P. AND MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. Jour nal American Oils Chemistry Society, 1990.

BOSSAERT, W.; DE VOS, D. WIM, M. AND RHIIN, V. Mesoporuos Solfonic Acids as Selective Heterogeneuos Catalysts fort the Synthesis of Monoglycerides Journal of Catalysis, 1999.

CASTELLANOS MOLINA, Fabian Enrique; GONZALEZ SANTOS, Rosa Alexandra. Síntesis de Ésteres Alquílicos mediante Alcoholisis del Aceite de Palmaste utilizando como Catalizador Lipasa de Trucar Miehei. Proyecto de Pregrado. Escuela de Química (UIS), 2004.

CORMA, A., IBARRA, S. AND PRIMO, J. Catalysts for the Production of Fine Chemicals. Journal of Catalisis, 1998.

CORNELIUS, A. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by inmobilized Mucor miehel J.A. J. Am. Oil Chem. Soc. 1997.

CHANG, P.S. AND RHEE I.S. Characteristcs of lipase – catalyzed glycerolysis of triglyceride in AOT – Isooctane reversed micelles. Biocatalysis, 1990.

CHANG, P.S., RHEE, J.S. AND KIM, J. Continuous glycerolysis of Olive Oil by Chromobacterium Viscosum Lipase Immobilized on Liposome in reversed micelles. Biotechnol. Bioeng, 1991.

DEFENSE, E. Fractination of Palma Oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 1985.

ERGAN, F.; BIRNBAUM, H. AND LEDERER, J. Process for Producing Monoglycerides of Fatty Acids. J. Am. Oil Chem. Soc., 1989.

ERGAN, F., TRANI, M. AND ANDRÉ, G. Production of Glycerides from Glyceriol and Fatty Acid gy Immobilized Lipases Non-aqueous Media. Biotechnology and Bioengineering, 1990.

FEDEPALMA. Estadísticas (on line). Bogotá; Colombia, 2003. Disponible en internet: <http://www.fedepalma.org>

FLECTCHER, P., FREEDMAN, R., ROBINSON, B. REES, G. AND SCHOMACKER, R. Providing Biocatalysts through customizing lipases by different processes. Biochim. Biophys, 1987.

FOGLIA, T., PETRUSO, K. AND FEARIRHELLER, S. Enzymatic Interesterification of Tallow-Sunflower Oil Mixture, J. Am. Oil. Chem. Soc., 1993.

GEERAERT, E., SANDRA, P. Capillary CG of Triglycerides in Fats and Oils Using a High Temperature Phenylmethylsilicone Stationary Phase. Part II. The Analysis of Chocolate Fats. J. Am. Oil Chem. Soc., 1987.

GHAZALI, H., HAMIDAH AND CHEMAN, Y. Enzymatic Transesterification of Palm Olein with Nonspecific and 1,3 –Specific Lipases. J. Am. Oil Che. Soc., 1995.

HARMEIER, F.; GHAZALI, H.; HAMIDAM, S. AND CHEMAN, Y. Enzymatic Transesterification of Palm Olein with Nonspecific and 1, 3 – Specific Lipases. J. Am. Oil Chem. Soc., 1995.

HEARING, G. AND LUISI, PL. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions. J. Phys Chem, 1986.

HOLMBERG, K. AND OSTERBERG. Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications In Biotechnology J., J. Am. Oil Chem. Soc., 1988.

HOLMBERG, K., LASSEN, B. AND STARK, M. Enzymatic Glycerolysis of a Triglyceride in Aqueous and Nonaqueous Microemulsions. J. Am. Oil Chem. Soc., 1989.

HOLMBERG, K., LASSEN, B. AND STARK, M. J. Am. Oil Chem. Soc, 1989.

Hoq, M:M,.YAMANE. J. Lipase Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 1984.

KIFII, H., OOI, T. L. AND AHMAD, S. Progress in research an development for the Malaysian Oleochemical Industry. Palm Oil Technical Belletin (Malasia), 1996.

KIRK AND OTHMER. Encyclopeda of Chemical Technology. Interscience, New York, 1967.

KRISHNA, T. AND SONNET, P. LIPASE SELECTIVITIES. J. Am. Oil Chem. Soc., 1998.

LOCK, M. YLAURIDSEN J. Glycerolysis of Fts and Oils an Inorganic Catalyst. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1976.

MARANGONI, A., McCURDY, R. AND BROWN, E. Enzymatic Interesterification of Triolein with Tripalmitin in Canola Lecithin- Hexane Reverse Micelles. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1993.

McCRAE, A., ROEHL, E. AND BRAND, H. Effect of lipase specificity on triglycerides synthesis. Biotechnology Letters, 1990.

McNEILL, G.P., SHIMIZU, S., AND YAMANE, T. Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride J. Am Oil Chem. Soc., 1990.

McNEILL, P.G. AND YAMANE, T. Further Improvements en the Yield of Monoglycerides During Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oil, J. Am Oil Chem, Soc., 1991.

MOJOVIC, L., MARINKOVIC, S., KUKIC, G. AND NOVAKUVIC, G. Lipase specificities. Potencial application in lipid bioconversions Enzyme Microb. Technol, 1993.

MORENO, N. y PEREA, A. Búsqueda de Nuevas Alternativas para la utilización del aceite de Palma: Obtención de Equivalentes de la Manteca de Cacao por Interesterificación Enzimática. Tesis de Grado (maestría en química). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga;Colombia, 2001.

NOUREDDINI, H. AND HARMEIER, S. Enzymatic Glycerolysis of Soybean Oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 1998.

OSIPOW, L.I. Surface Chemistry, Theory and Industrial Applications. Chapman and Hall. New York,1962.

PANDEY, A., SAILAS, B., SOCCOL, C.R. NIGAM, P., KRIEGER. N. AND SOCCOL. V.T. Review: The Real of Microbial Liases in Biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem, 1999.

PECNIK, L. AND SWERN, D. Barley`s Industrial Oil and Fat Products, John Wiley ad Sons, 1992.

PEREIRA, M. AND DA SILVA, R. Glicerolysis Enzimática de Trilaurina sin solvente. XIX Simposio Iberoamericano de Catálisis. Mérida, Yucantan: México, 2004.

PETRUSKAITE, V., GREYT, M. AND KELLENS, M. Physical and Chemical Properties of Trans-Free Produced By Chemical Interesterification of Vegetable Oil Blends, J. Am. Oil Chem. Soc., 1998.

POTTS, R. AND MUCKERHEIDE, V. Production of Fatty acids, in Fatty Acids on Their Industrial Application, edited by Pattison, E. AND Dekker, M. Inc. New York, 1968.

POUILLOUX, Y.; ABRO, S., AND BARRAULT, J. Heterogeneous Catalysis and Fine Chemicals IV. Stud. Surf. Sci. Catal, 2000.

POUILLOUX, Y; METAYER, S.; BARRAULT, J. Síntesis of Glycerol Monoctadecanoate from Octadecanoic Acid and Glycerol. Influence of Solvent on the Catalytic Properties of Basic Oxides. C.R. Acad. Sci. Paris, 1999.

QUESADA, P. Modification of Triglycerides by Lipases: Process Technology and its Application to the Production of Nutritionally Improved Fats, 1993.

QUELLET, C. EICKE, H-F. Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsions. Chimia, 1986.

RHEINECK, A. BERGSETH, R., AND SREENNIVASAN, B. Glycerolysis of Linseed Oil: A Compositional Study., J. Am. Oil chem. Soc., 1968.

ROSEN, M.J. Surfactants and Interfacial Phenomena. Wiley Interscience Publication. New York. 1978. Enzyme and Microbial Technology, 1997.

SELMİ, B., GONTIER, E., ERGAN, F., BARBOTIN, J.N. AND THOMAS, D. Lipas - catalyzed synthesis of tricaprylin in a medium solely. Composed of substrates. Water production and elimination. Enzyme and Microbial Technology, 1997.

SELMİ, B., CONTIER, E. ERGAN, F. AND THOMAS, D. Effects of acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by

immobilized lipase in solvent – free medium, Enzyme and Microbial Technology, 1998.

SINGH, C., SHAH, D. AND HOLMBERG, K. Synthesis of Mono- and Diglycerides in water-in-oil Microemulsions. J. Am. Oil Chem. Soc., 1994.

SONTAG, N.O. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters – Status. J. Am. Oil Chem., 1982.

STAMATIS, H., XENAKIS, A. AND KOLISIS, F. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. Elsevier Science Inc., 1999
SWERN, D. AND BAILEY, S. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized. Oil and Fat Products, 1979.

TRAITLER, H., DIEFFENBACHER, A. AND KOLAROVIC, L. Fryng Performance of Palm Oil Liquid Fractions. Am. Oil Chem. Soc., 1985.

VAN, R.; JACOB, P. AND BOSSAERT, W. Synthesis of Monoglycerides for Heterogeneous Catalysts. Chem. Commun, 1998.

VERGER, R. Enzyme Kinetics of Lipolysis. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. Methods in Enzymology., 1980.

WATANABE, A., TASHIMA, I., MATGUZAKIN, N., KURASHIGE, J. AND STATO, K. on the Formation of Granular Crystals in Fat Blends Containing Palm Oil. J. Am. Oil Chem. Soc, 2001.

WIN, D., BOSSAERT, D. AND VAN, R. Mesoporous Sulfonic Acids Selective Heterogeneous Catalysts for the Synthesis of Monoglycerides. Journal of Catalysts, 1999.

WU, L., MACRAE, A., AND HAMMOND, R. Present and Future Applications of Lipase. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 1999.

YAMANE, T., HOQ, M., ITOH, S., SHIMIZU, S. Continuous glycerolysis of fat by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor., J. Jpn Oil Chem. Soc., 1986.

YAMANE, T. J. Glycerolysis of fat by lipase., J. Jpn Oil Chem. Soc., 1986.

YOUNG, F.V.K. Refining and Fractionation of Palm Oil., John Wile & Sons., 1987.

ZAHER, B.; SAADIA, M. Lifase – Catalyzed Glycerolysis of Sunflower Oil to Produce Partial Glycerides. Grasas y Aceites, 1998.

ZAHER, F., SAADIA, M. AND EL-KINAWY, O. Lipase- Catalyzed Glycerolysis of Sunflower Oil to Produce Partial Glycerides. Grasas y Aceites, 1998.

ZUMBADO, M. E. Utilización de Productos de la Palma Africana en la Alimentación Aviar. Avicultura Profesional (Costa Rica), 1990.