

**OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE CITRONELOL POR VÍA ENZIMÁTICA
ESTUDIO CINÉTICO**

Autor:

Ing. ERICK RODRIGUEZ PEÑA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS
CICTA**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES PARA LA
AGROINDUSTRIALIZACIÓN DE ESPECIES VEGETALES AROMÁTICAS Y
MEDICINALES TROPICALES
CENIVAM**

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

2009

**OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE CITRONELOL POR VÍA ENZIMÁTICA
ESTUDIO CINÉTICO**

Trabajo de Maestría
Para optar al título de magíster en Ingeniería Química

Autor:
Ing. ERICK RODRIGUEZ PEÑA

DIRECTORA: Química, MSc, Doctora en Química. Janeth Aidé Perea Villamil

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS
CICTA**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES PARA LA
AGROINDUSTRIALIZACIÓN DE ESPECIES VEGETALES AROMÁTICAS Y
MEDICINALES TROPICALES
CENIVAM**

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

2009

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

A mi directora Janeth Aidé Perea Villamil, por su paciencia y amistad a lo largo de mi carrera profesional.

A mi compañero del alma Alfredo, por su compañía y solidaridad en el desarrollo de esta meta tan anhelada.

A todos mis compañeros y amigos del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA – UIS.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ALCANCE DE LA PRESENTE TESIS	6
1. ESTADO DEL ARTE	8
1.1 Reacciones de interesterificación	10
1.2 Mecanismos cinéticos	14
1.2.1 Mecanismo secuencial u ordenado	15
1.2.2 Mecanismo Ping Pong	16
1.3 Diseño básico del reactor enzimático sobre condiciones ideales	17
1.3.1 Reactor enzimático por lotes	19
1.3.2 Reactor de lecho empacado	21
1.3.3 Reactor de tanque agitado	22
2. METODOLOGÍA	25
2.1 Materiales	25
2.1.1 Reactivos	25
2.1.2 Enzimas	25
2.2 Desarrollo experimental	25
2.2.1 Alcohólisis enzimática	27
2.2.2 Screening de lipasas	28
2.2.3 Evaluación de las restricciones difusionales	28
2.2.4 Determinación de las condiciones óptimas	30
2.2.5 Evaluación de la cinética de la reacción	31
2.3 Métodos de análisis	34
2.3.1 Determinación de la actividad hidrolítica de la enzima	34
2.3.2 Determinación de la actividad esterificante	35

2.3.3	Análisis de ácidos grasos	36
2.3.4	Análisis de ésteres de citronelol	36
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1	Screening de lipasas	38
3.2	Restricciones difusionales	41
3.3	Determinación de las condiciones optima	44
3.4	Evaluación de los modelos cinéticos para la reacción de alcoholisis	53
3.4.1	Determinación de los parámetros del modelo	55
3.5	Diseño básico del reactor enzimático sobre condiciones ideales	61
4.	CONCLUSIONES	65
	BIBLIOGRAFIA	66
	ANEXOS	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental aplicado para la selección de la enzima en la reacción de alcoholólisis	29
Tabla 2. Variables independientes y niveles del diseño	30
Tabla 3. Diseño experimental para el estudio cinético	31
Tabla 4. Composición (%) de ácidos grasos de los diferentes sustratos empleados en la reacción de alcoholólisis.	37
Tabla 5. Actividad esterificante de las lipasas	39
Tabla 6. Diseño experimental para screening de lipasas	39
Tabla 7. Fracciones másicas de cada incremento sobre los tamices	43
Tabla 8. Variables independientes y niveles del diseño	44
Tabla 9. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto 2^3 + estrella (CCRD) aplicado a la reacción de alcoholólisis.	45
Tabla 10. Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta Y_1 (conversión de citronelol (%))	48
Tabla 11. Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad	52
Tabla 12. Velocidades de reacción calculadas a partir de los datos experimentales	55
Tabla 13. Parámetros cinéticos para los modelos evaluados	57
Tabla 14. Densidades experimentales	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas enantioméricas del citronelol	9
Figura 2. Diagrama de las reacciones principales catalizadas por lipasas.	11
Figura 3. Representación del Mecanismo Secuencial Ordenado Bi Bi	16
Figura 4. Representación del Mecanismo Ping Pong Bi Bi	17
Figura 5. Diagrama de bloques del desarrollo experimental	26
Figura 6. Screening de lipasas a 40 °C en un sistema libre de solvente	40
Figura 7. Screening de lipasas a 60 °C en un sistema libre de solvente	41
Figura 8a. Influencia de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de reacción	41
Figura 8b. Influencia de la velocidad de agitación en la conversión de citronelol (%)	42
Figura 9. Análisis diferencial por tamizado	43
Figura 10. Test experimental para evaluar la influencia del diámetro de partícula del catalizador en la conversión	44
Figura 11. Diagrama de los efectos principales para Y_1 (conversión de citronelol (%))	46
Figura 12. Diagrama de pareto para la variable de respuesta Y_1 (conversión del citronelol (%))	47

Figura 13. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de temperatura y relación de sustratos (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)	49
Figura 14. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de temperatura y cantidad de enzima (%) (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)	50
Figura 15. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de relación de sustratos y cantidad de enzima (%) (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)	51
Figura 16. Densidades experimentales versus relación molar de sustratos	54
Figura 17. Comparación del modelo predictivo y los datos experimentales de velocidad inicial de reacción. (Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palma – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm)	58
Figura 18. Comparación del modelo predictivo y los datos experimentales de la velocidad inicial de reacción. (Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palma hidrogenado – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm)	59
Figura 19. Comparación del modelo predictivo y los datos experimentales de la velocidad inicial de reacción. (Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palmiste – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm)	59

- Figura 20.** Desempeño de un reactor por lotes para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol) como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM) 61
- Figura 21.** Desempeño de un reactor de lecho empacado para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol), como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM) 62
- Figura 22.** Desempeño de un reactor de tanque agitado para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol), como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM) 62
- Figura 23.** Desempeño de los reactores CPBR y CSTR para una cinética Ping Pong Bi Bi (A como sustrato limitante). $a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM; $a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM 63
- Figura 24.** Desempeño de los reactores CPBR y CSTR para una cinética Ping Pong Bi Bi (B como sustrato limitante). $a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM; $a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM 64
- Figura 25.** Gráficas para determinar la actividad hidrolítica de las enzimas 79
- Figura 26.** Gráficas comparativas entre la actividad hidrolítica y la actividad esterificante de las lipasas evaluadas 80

RESUMEN

TITULO: Obtención de ésteres de citronelol por vía enzimática: estudio cinético*

AUTOR: Erick Rodríguez Peña**

PALABRAS CLAVES: Alcohólisis; Lipozyme TL IM; Metodología de superficie de respuesta.

DESCRIPCIÓN:

El presente trabajo consistió en el estudio de la cinética enzimática en un medio libre de solvente para la reacción de alcohólisis entre el aceite de palmiste y el citronelol catalizada por la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM). Inicialmente, se determinó que la enzima Lipozyme TL IM no presenta restricciones difusionales internas para el sistema aceite de palmiste – citronelol y en cuanto a las restricciones difusionales externas, estas son negligentes a velocidades de agitación por encima de las 200 rpm.

Usando la metodología de superficie de respuesta (RSM), se evaluaron y optimizaron las variables de operación: temperatura, relación molar de sustratos y cantidad de catalizador. Se logró la producción de ésteres de citronelol a través de la reacción de alcohólisis alcanzándose un valor máximo de conversión del 71,9% a 67°C, 3 horas de reacción, relación molar de sustratos aceite/alcohol 1:4,3 y cantidad enzima con respecto al peso del aceite inicial del 11%.

Para la cinética de la reacción de alcohólisis se evaluaron cuatro modelos cinéticos que describían el mecanismo seguido por la enzima a las condiciones optimizadas. En cuanto al sistema aceite de palmiste y citronelol se determinó que sigue un mecanismo Ping Pong Bi Bi. Los sistemas menos complejos como el aceite de palmiste hidrogenado – citronelol y el aceite de palma hidrogenado citronelol siguen un mecanismo Ordenado Bi Bi con inhibición por alcohol.

Finalmente, se estableció que el mejor sistema para escalar el proceso a nivel de laboratorio es el reactor de lecho empacado.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ingeniería Físico – Químicas, Escuela de Ingeniería Química: Directora: Janeth Aide Perea Villamil

ABSTRAC

TITLE: Procurement of esters enzymatically citronellol: Kinetic study*

AUTOR: Erick Rodríguez Peña**

KEYWORDS: Alcoholysis; Lipozyme TL IM; Response Surface Methodology (RMS).

DESCRIPTION

This work concerns the study of enzyme kinetics in a solvent-free medium for the alcoholysis reaction between palm kernel oil and citronellol catalyzed by immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM). Initially, it was determined that the enzyme Lipozyme TL IM has no internal diffusional restrictions to the system palm kernel oil - citronellol and external diffusional restrictions, they are negligible agitation speeds above 200 rpm.

Using response surface methodology (RMS), were evaluated and optimized operating variables: temperature, substrate molar ratio and amount of catalyst. Production was achieved citronellol esters through alcoholysis reaction reaching a maximum conversion value of 71.9% at 67 ° C, 3 hours of reaction, substrate molar ratio oil / alcohol 1:4.3 and enzyme amount over the initial oil weight of 11%.

For the kinetics of alcoholysis was assessed four kinetic models describing the mechanism followed by the enzyme at optimized conditions. For the system palm kernel oil and citronellol was determined that follows a Ping Pong Bi Bi mechanism. Less complex systems such as hydrogenated palm kernel oil - citronellol and hydrogenated palm oil are citronellol Ordered Bi Bi mechanism with inhibition by alcohol.

Finally, it was established that the best system for scaling the laboratory-scale process is the packed bed reactor.

* Graduate Project

** Faculty of Physical – Chemical Engineering, School of Chemical Engineering: Director: Janeth Aide Perea Villamil

INTRODUCCION

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 se pueden dividir en tres grandes categorías: aceites esenciales, productos aislados de esencias (eugenol, anetol, citral, etc.), y productos obtenidos por semisíntesis a partir de las esencias naturales (iononas, terpineol, dihidromircenol). [Swift; 2004]

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas con un sin número de compuestos en concentraciones diversas [Bakkali y col; 2008]. Generalmente, su composición química se caracteriza por dos o tres compuestos mayoritarios que determinan las propiedades biológicas y organolépticas y por ello, se han clasificado en dos grupos: un grupo principal formado por terpenos y terpenoides y un segundo grupo constituido por compuestos aromáticos y alifáticos; todos caracterizados por tener bajo peso molecular [Croteau y col., 2000; Betts, 2001].

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. Entre los alcoholes terpénicos acíclicos, el geraniol y el citronelol son de gran importancia comercialmente para la medicina tradicional y la industria, porque son productos químicos que tienen un amplio uso como ingredientes de jabones, perfumes, cosméticos y aromatizantes. De igual manera, el citronelol se emplea como materia prima para la síntesis química de otros compuestos. Se encuentra naturalmente en el aceite de citronela, obtenido a partir de las hojas y los tallos de diferentes especies de *Cymbopogon*, incluida la *Cymbopogon nardos*. Asimismo,

se halla presente en los aceites esenciales de rosa (23 -30%), [Hasan y col., 2005, Özel y col., 2006] geranio (25 – 37%) [Jain y col., 2001, Kiran y col., 2005, Peterson y col., 2006] y *Eucalyptus citriodora*, (8,8%) [Rajeswara y col., 2003].

Los ésteres son compuestos líquidos y sólidos que poseen olores agradables, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en flores y frutas. En el comercio son utilizados como materia prima en perfumes, esencias saborizantes y confites, también son usados como solventes, como agentes sintéticos, y para la preparación de plásticos. Dada la importancia de los ésteres se han desarrollado muchos procesos químicos para su obtención; el más común, es el calentamiento de una mezcla del alcohol y del ácido correspondiente en presencia de ácido sulfúrico como catalizador (esterificación de Fischer-Speier¹) [Amish y col., 2010]. El ácido sulfúrico sirve en este caso tanto de catalizador como de sustancia higroscópica que absorbe el agua formada en la reacción. En general, este procedimiento requiere de temperaturas elevadas y de tiempos de reacción largos presentando por tanto inconvenientes. Otro proceso es la utilización del cloruro del ácido y el alcohol en la presencia de piridina. También se utilizan procesos de transesterificación donde se hace reaccionar un éster con un alcohol en presencia de un catalizador como el tetracloruro de germanio, otro ácido de Lewis o trazas de base. Este proceso se emplea industrialmente sobre todo en la obtención del PET (polietilentereftalato), un plástico transparente que se usa por ejemplo para fabricar botellas de bebida.

Varios ésteres monoterpénicos de ácidos grasos de cadena corta y media, como el citronelol acetato, el citronelol valerato, el citronelol butirato, el citronelol capriato, el citronelol caprilato y el citronelol laurato se encuentran entre los componentes de aromas naturales más ampliamente usados en la industria de alimentos [Yadav y col., 2004, Serri y Kamaruddin., 2006, Bezbradica y col; 2006]

¹ La esterificación de Fischer-Speier o esterificación de Fischer es un tipo especial de esterificación que consiste en la formación de un éster por reflujo de un ácido carboxílico y un alcohol, en presencia de un catalizador ácido.

muchos de ellos se obtienen por métodos tradicionales que incluyen la síntesis química, la fermentación directa o la extracción de sus fuentes naturales; procesos que generalmente presentan desventajas a nivel técnico y económico. Un ejemplo son los ésteres naturales extraídos de las plantas que a menudo son escasos o demasiado costosos para su uso comercial. La síntesis química 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 y col., 2001; Aguilar y col., 2005; Kolicheski y col., 2007]. Es por ello, que los compuestos sintetizados químicamente no son considerados productos naturales y son de menor valor comercial. Por lo anterior, la aplicación de biocatalizadores constituye una opción, debido a que los productos sintetizados por métodos enzimáticos o usando microorganismos, sí 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].

En la última década los investigadores han sintetizado enzimáticamente compuestos de naturaleza éster con diversos aromas, por reacciones de esterificación, acidólisis y alcoholólisis [Bezbradica y col, 2006; Yadav y col, 2008]. Dentro de este grupo de compuestos se ha evaluado la síntesis de ésteres de naturaleza térpenica [Serri y Kamaruddin, 2006] usando lipasas de diferentes microorganismos variando el tipo de alcohol, la clase de enzima, la relación enzima-sustrato, la temperatura, el tiempo de reacción, la agitación, el contenido de agua y la presencia o ausencia de solvente. Como sustratos se han empleado citronelol, geraniol y ácidos grasos de cadena corta puros y como catalizadores lipasas de *Mucor miehi*, *Aspergillus sp*, *Candida rugosa* y *Rhizopus arrhizus* [Chatterjee y Bhattacharyya., 1999, Yee y col., 1995] y *Candida antartica* SP435 [Claon y col, 1994].

La reacción de esterificación es la más usada en la producción de ésteres de citronelol [Serri y col., 2009; Abdullah y col., 2009], sin embargo, en 1997, Castro y col., determinaron que la mejor estrategia para la producción de estos compuestos es la reacción de alcoholisis. Chatterjee y Bhattacharyya; 1999 sintetizaron ésteres de citronelol y geraniol con aceite de coco (rico en ácido láurico) usando lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme IM*) en un sistema libre de solvente, siendo uno de los escasos trabajos que se encuentran reportados (Anexo 5).

En este contexto, el mecanismo de la reacción de alcoholisis para la obtención de esteres terpénicos en ausencia de solvente no ha sido estudiado ampliamente, a pesar de que esta información se requiere para escalar el proceso a nivel industrial. Contrario ocurre con las reacciones de acidólisis y de esterificación cuyo mecanismo de reacción es ampliamente conocido. Se encuentran los estudios de Paiva y col., 2008 y Al-Zuhair y col., 2007 que evaluaron las reacciones de alcoholisis usando lipasas inmovilizadas y determinaron que está reacción es más compleja en comparación con la reacción de hidrólisis al momento de modelarlas

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se realizaron estudios orientados a establecer la cinética de la reacción de alcoholisis en ausencia de solvente, para la obtención de ésteres de citronelol usando como fuente de triglicéridos el aceite de palmiste cuyo principal componente es el ácido láurico, como un estudio preliminar a su producción industrial. Previamente se realizó un screening con diferentes enzimas comerciales para evaluar su potencial en la reacción, seguidamente con la enzima seleccionada se establecieron las mejores condiciones para alcanzar el mayor nivel de conversión definido como la cantidad porcentual de citronelol que reacciona. Posteriormente se realizó un proceso de simulación utilizando el software Polymath Professional versión 6.1 para resolver el modelo cinético que describa el mecanismo de reacción del sistema evaluado y sirva de base para el diseño de una unidad de reacción.

De esta forma se pretende sentar las bases para desarrollar un proceso que permita obtener productos de amplio uso en la industria catalogados como naturales. Así se contribuye a apoyar la cadena productiva de aceites esenciales, la cual requiere la producción y comercialización de derivados de las plantas medicinales y aromáticas, principal objetivo del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM); además de la cadena productiva de la palma de aceite, cuyo cultivo en Colombia tiene una dinámica de expansión continua [Fedepalma, 2008]

El proyecto, financiado por COLCIENCIAS a través de CENIVAM, se desarrolló en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos -CICTA de la UIS. Los resultados de esta investigación han sido publicados y presentados en varios eventos, a saber:

Rodríguez, E., Perea, A., Castellanos, F. Producción enzimática de ésteres de citronelol. En: *Scientia Et Technica*, 2007, Vol. **33**, p. 37 - 40

Rodríguez, E., Perea, A., Torres, R. Enzymatic synthesis of citronellol esters: A kinetic study. *Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. **131**, Issue 2, S110. 13th European Congress on Biotechnology.

Rodríguez, E., Stashenko, E., Perea, A. Estudio de la obtención de aromatizantes por transesterificación usando lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. XV Congreso Colombiano de Química. *Noticias Químicas*, 2008, Vol. **10**, N° 82, p. 30

Rodríguez, E., Perea, A. Utilización del aceite de palmiste y del citronelol en la producción de aromatizantes. XVI Conferencia Internacional sobre Palma de Aceite 2009. En: *Revista Palmas*, en prensa.

ALCANCE DE LA PRESENTE TESIS

Los ésteres de citronelol se usan ampliamente en la industria porque son productos químicos que tienen un extenso uso en jabones, perfumería, cosméticos y aromatizantes, pero para escalamiento a nivel industrial se requiere una selección adecuada del catalizador, de las condiciones de reacción y especialmente del conocimiento preciso de la cinética de la reacción.

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones sobre producción de ésteres de citronelol se han basado en una reacción de esterificación utilizando ácido grasos puros de cadena corta (caprónico, caprílico, cáprico) y lipasas no disponibles comercialmente, excepto Lipozyme RM IM y Novozymes 435. En esta tesis se propone evaluar la reacción de estos compuestos mediante una reacción de alcoholisis utilizando materias primas provenientes de la cadena productiva de la industria del aceite de palma (aceite de palmiste) y las esencias naturales (citronelol), con el fin de generar productos de mayor valor agregado.

En este contexto el objetivo general del proyecto fue evaluar el proceso de producción de ésteres de citronelol por medio de la reacción de alcoholisis catalizada por lipasas comerciales en un medio libre de solvente.

Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Evaluar cuatro lipasas comerciales y seleccionar la que permite obtener mayores niveles de porcentaje de conversión del citronelol a ésteres.

- ✓ Usando la enzima seleccionada, determinar el efecto de los parámetros de reacción y operación (temperatura, relación molar de sustratos aceite/alcohol y cantidad de enzima) sobre la conversión del citronelol.

- ✓ Evaluar modelos cinéticos que describan el mecanismo de la reacción de alcoholísis entre el aceite de palmiste y el citronelol en un medio libre de solvente aplicable a diseños básicos de ingeniería.

De esta forma la hipótesis planteada es:

A partir de los datos experimentales es posible evaluar modelos matemáticos que describan la cinética de la reacción de alcoholísis para la producción de ésteres de citronelol en ausencia de solventes

1. ESTADO DEL ARTE

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 son un grupo de compuestos lipídicos diverso y numeroso formado por alrededor de 30,000 sustancias que presentan diversas características, son insolubles o parcialmente miscibles en agua, son biosintetizados a partir del acetyl-CoA o intermediarios de la glicólisis, son compuestos derivados de la unión de unidades isopreno de 5-carbonos (C_5H_8), se conocen también como isoprenos o isoprenoides y como terpenoides si se encuentran presentes otros elementos (especialmente oxígeno) [Armando y col., 2008].

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno. Los hemiterpenos contienen 1 unidad de isopreno (5-C), los monoterpenos contienen 2 unidades de isopreno (10-C), los sesquiterpenos contienen 3 unidades de isopreno (15-C), los diterpenos contienen 4 unidades de isopreno (20-C), los triterpenos contienen 6 unidades de isopreno (30-C), los tetraterpenos contienen 8 unidades de isopreno (40-C) y finalmente los politerpenos - más de 10 unidades de isopreno [Stephen y col., 2008]. Los derivados oxigenados de los terpénicos están conformados por éteres, alcoholes, ácidos y ésteres.

El citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) (Fig. 1), es un alcohol terpénico fragante presente en más de treinta aceites esenciales. Los aceites esenciales ricos en (-)-citronelol se extraen de las diferentes especies de rosas: *Rosa búlgara* y geranio de Reunión y Madagascar (80%), *Rosa rugosa* y geranio Africano Oriental (50%)

[Sell, 2003]. El aceite esencial de *Rosa damascena*, contiene mayoritariamente los alcoholes citronelol, geraniol, nerol, fenil etanol, metil eugenol y ciertas parafinas. Compuestos minoritarios importantes por la alta aromaticidad son el (-)-*cis*-óxido de rosa (0.5 %), β -damascenona (0.1%), β -ionona, 1-*p* menten-9-al y rosa furano [Ohloff, 1994; Muller, 1991; Jirovetz, 2005; Joichl, 2005]. En el té negro, el vino y ciertas frutas, el citronelol se encuentra en un porcentaje menor al 10%. En especies como *Boronia citridora* y *Eucalyptus citridora* predomina el (+)-citronelol [Demyttenaere y col., 2004].

Los terpenos tienen propiedades organolépticas específicas que los convierten en materias primas apetecidas en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética debido a su uso como saborizantes y aromatizantes. Sin embargo, su producción a gran escala se lleva a cabo por procesos químicos que no son específicos y consecuentemente requieren etapas elaboradas de purificación que elevan el costo de su manufactura [Semikolenov y col., 2001; Aguilar y col., 2005; Kolicheski y col., 2007]. Entre los alcoholes terpénicos de uso comercial el citronelol es ampliamente usado en la producción de ésteres por síntesis química; sin embargo, esta presenta limitaciones asociadas al tipo de catalizador usado. Una alternativa a la síntesis química de los aromatizantes y saborizantes es su obtención por métodos enzimáticos. [Salah y col., 2007; Yadav y col., 2008].

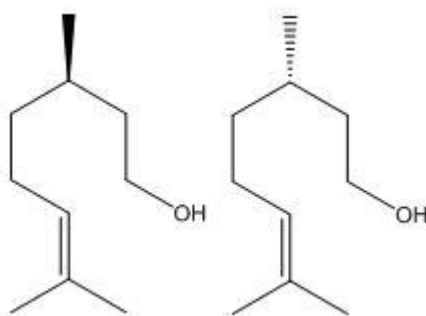


Figura 1. Formas enantioméricas del citronelol

Las enzimas son excelentes catalizadores que trabajan en condiciones de operación que facilitan su manipulación, recuperación y reutilización. Igualmente, su alta regioespecificidad y estereoespecificidad permiten la síntesis de productos de gran aceptabilidad en la industria alimenticia por el alto grado de pureza de los mismos [Ghanem ashraf., 2007].

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3) son enzimas con un gran potencial industrial debido a que no necesitan cofactores en sus reacciones, son versátiles y catalizan un amplio rango de reacciones de bioconversión que incluyen la hidrólisis, la esterificación, la acidólisis, la alcoholólisis, y la transesterificación. Actualmente, la síntesis enzimática de ésteres llevada a cabo por las lipasas es cada vez más atractiva para las industrias dedicadas a la producción de nuevas aromas y sabores debido a su disponibilidad en el mercado en forma nativa o inmovilizada, a bajo costo.

1.1 Reacciones de interesterificación

Las lipasas han sido diseñadas originalmente por la naturaleza para catalizar el rompimiento de los enlaces ésteres por medio de reacciones de hidrólisis (con el consumo simultáneo de moléculas de agua). Sin embargo, en las reacciones químicas a nivel molecular se puede presentar la reacción inversa, en este caso la síntesis de ésteres debido al principio de microreversibilidad. De acuerdo con este principio, la conversión en el equilibrio depende simplemente del contenido de agua en la mezcla de reacción. Es así, como la reacción de hidrólisis es promovida por un sistema macroacuso y la reacción de síntesis de ésteres es promovida por un sistema microacuso. Estos dos procesos básicos pueden ser combinados en un modo secuencial para dar lugar a un conjunto de reacciones que usualmente se llaman interesterificaciones. Dependiendo de los sustratos

iniciales para cada reacción, se puede obtener una reacción de acidólisis², alcoholólisis³ o transesterificación⁴ (Fig. 2).

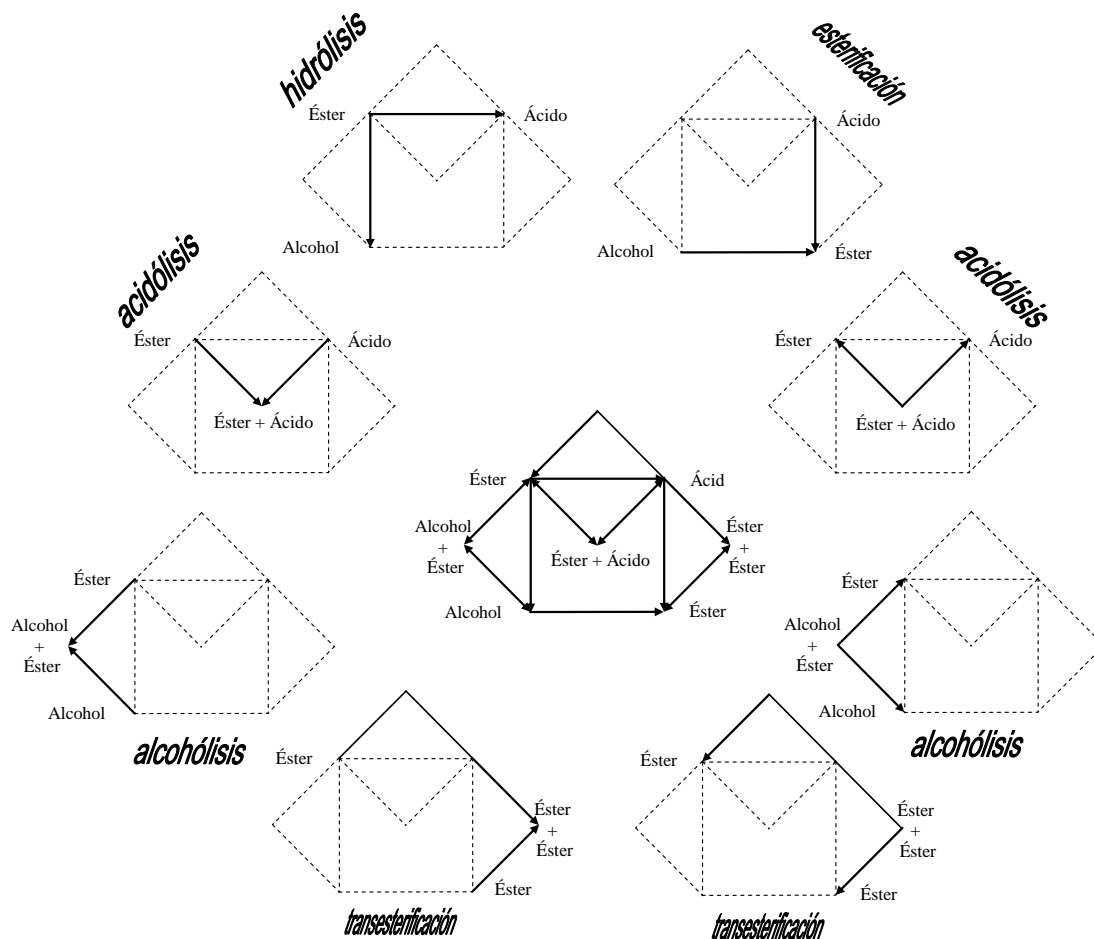


Figura 2. Diagrama de las reacciones principales catalizadas por lipasas. Los reactivos se representan al inicio de las flechas, los productos se representan tras el final de flechas.

Las primeras investigaciones enfocadas a la síntesis de acilglicéridos⁵ se llevaron a cabo en el año de 1964 por Iwai y col., 1963 quienes usaron como catalizador

² Reacción donde un grupo acil es desplazado entre un grupo funcional éster y un grupo funcional ácido carboxílico

³ Reacción donde un grupo acil es desplazado entre un grupo funcional éster y un grupo funcional alcohol

⁴ Reacción donde dos grupos acilos son intercambiados entre dos grupos funcionales éster

⁵ Ésteres formados por ácidos grasos y glicerina unidos mediante una reacción de esterificación.

una lipasa cruda proveniente de *Aspergillus niger*. Posteriormente, el uso de sustratos como: ácidos grasos y alcoholes de naturaleza alifática, aromática y terpénica demostraron que las lipasas podían ser utilizadas en la síntesis de ésteres además de las reacciones de hidrólisis.

A partir de la década de los noventa, los trabajos realizados sobre la reacción de esterificación se enfocaron en la mejora de las condiciones de operación para la síntesis de ésteres. Inicialmente se evaluaron las lipasas disponibles a nivel comercial verificando su habilidad catalítica en la formación de estos productos. Luego, se aplicaron métodos de inmovilización enzimática que permitían un mejor desempeño de la lipasa por el aumento de su estabilidad. Finalmente, se estudio el efecto de la longitud de la cadena del ácido usado en la reacción, la naturaleza del alcohol, el tiempo de incubación, la temperatura, la adición del agua al medio de reacción y la adición de solventes.

Con la adición de solventes al medio de reacción se incrementaba la solubilidad de los sustratos y se minimizaban las limitaciones difusionales por la migración de los sustratos hacia el catalizador permitiendo un mejor desempeño de las enzimas, es por ello, que varios autores usaron solventes orgánicos y determinaron que su uso en las reacciones enzimáticas representaba una ventaja en la síntesis preparativa de los ésteres [Marlot y col., 1985; Langrand y col., 1988; Castro y col., 1997; Melo y col., 2005] Dentro de los solventes más usados figuran el heptano [Langrand y col., 1990; Yadav y col., 2004], el hexano [Chulalaksananukul y col., 1992; Claon y Akon., 1994; Yee y col., 1995; Wang y col., 1995; Stamatis y col., 1998; Nakagawa y col., 1998; Akoh y col., 1998; Alves y col., 2003; Chowdary y Prapulla., 2003] y el ciclohexano [Abbas y col., 2003].

Diversas lipasas comerciales se han usado en la obtención de ésteres de naturaleza terpénica, sin embargo, los primeros estudios para obtener ésteres de citronelol a partir de ácidos grasos de cadena corta en un sistema con heptano

usando las lipasas de *Mucor miehi*, *Aspergillus sp*, *Candida rugosa* y *Rhizopus arrhizus* los realizaron Langrand y col., (1990) quienes observaron que la especificidad hacia el alcohol o el ácido por parte de las lipasas es un factor determinante en el grado de conversión para esta reacción.

En 1994 Claon y col., emplearon la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* SP435 en una reacción de alcoholisis en hexano para obtener ésteres de citronelol y geraniol usando como sustratos triacilgliceroles o ésteres de cadena corta y establecieron que las mayores productividades (> 98 %) de conversión molar sólo se obtenían al usar como sustrato los triacilgliceroles. Igual, Yee y col., en el año 1995 usando la lipasa de *Candida rugosa* reportaron que la tributirina y el citronelol son los mejores sustratos para la obtención de los ésteres terpénicos.

A pesar de los avances alcanzados en las reacciones de transesterificación en medios orgánicos, actualmente, el mercado desea la eliminación de los solventes en los procesos enzimáticos debido a que permiten desarrollar productos naturales y además simplifican las etapas de purificación. Varios investigadores han producido ésteres de cadena corta y media de geraniol y citronelol por esterificación directa en medios libres de solvente con el uso de diversas lipasas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus sp*, *Staphylococcus simulans*, *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme IM*) y *Candida antarctica*. No obstante, aunque la reacción de esterificación es la más usadas en la producción de ésteres de citronelol, Castro y col., (1997) determinaron que la mejor estrategia para la producción de ésteres de citronelol es el uso de la reacción de alcoholisis

En 1999 Chatterjee y Bhattacharyya, sintetizaron ésteres de citronelol y geraniol por medio de la reacción de alcoholisis con aceite de coco usando lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme IM*) en un sistema libre de solvente. En su estudio ellos determinaron las condiciones de reacción

adecuadas para obtener valores de conversión molar por encima del 50% y concluyeron que la eficiencia de las reacciones llevadas a cabo con lipasas inmovilizadas está determinada por parámetros como: la hidratación de la enzima, la temperatura de reacción, la concentración de los sustratos y la técnica de inmovilización aplicada.

A pesar de las ventajas alcanzadas por la utilización de las enzimas inmovilizadas, en la actualidad no existen procesos industriales que las usen para la producción de ésteres de naturaleza terpénica, pues, el alto costo de las enzimas ha sido, quizás, el factor más influyente y limitante para su uso a escala industrial [Gubicza y col., 2000]. Muchas investigaciones han evaluado diferentes fuentes de lipasas, métodos de extracción y purificación e inmovilización en diferentes soportes, con el fin de disminuir el costo de las mismas [Husum et al., 2005; D'Agostini, 2001; Macrae, 2000; Akoh, 1998].

1.2 Mecanismos cinéticos

El mecanismo cinético seguido por una enzima comprende la secuencia en donde los sustratos se unen a la enzima y luego los productos son liberados. Estos mecanismos pueden ser expresados en términos matemáticos, con base en las hipótesis de que las reacciones elementales son el resultado de rearrreglos unimoleculares o colisiones bi moleculares entre las moléculas y la enzima, y que tales procesos son totalmente aleatorios. [Leskovac Vladimir; 2003].

Muchos investigadores se han interesado a través de los años en definir los mecanismos cinéticos que siguen las enzimas en sus reacciones [Al-Zuhair Sulaiman, 2005; Torres y col., 2007; Pilarek y Szewczyk., 2007]. Para ello, es necesario describir la actividad catalítica de la misma en términos matemáticos precisos; sin embargo, alcanzar plenamente este objetivo implica la suposición de

los pasos elementales de la reacción que podrían ocurrir en el sistema a nivel molecular.

Es así como el desarrollo de la expresión de la velocidad para las reacciones catalizadas por lipasas es intrínsecamente dependiente de la complejidad del mecanismo de reacción postulado. Dado que las lipasas catalizan reacciones multisustrato, multiproducto, los modelos cinéticos que han sido propuestos de acuerdo con el mecanismo de reacción clásico unisustrato de Michaelis – Menten no permiten ofrecer una descripción precisa de los fenómenos químicos involucrados en estas reacciones. En cuanto a los mecanismos cinéticos llevados a cabo por las lipasas en las reacciones de interesterificación y específicamente en la reacción de alcoholólisis existen aún interrogantes; no obstante, varios autores asumen que las reacciones catalizadas por las lipasas ocurren por medio de la formación inicial de un intermediario enzimático. De esta forma, existen dos mecanismos cinéticos reconocidos para explicar las reacciones que involucran dos sustratos: el mecanismo no secuencial denominado Ping Pong y un mecanismo secuencial denominado complejo ternario u ordenado.

1.2.1. Mecanismo secuencial u ordenado

Las reacciones secuenciales son aquellas en las que todos los reactivos se unen a la enzima antes de que el primer producto sea liberado; se subdividen en las reacciones ordenadas en la que los reactivos y productos son unidos y liberados de manera secuencial obligatoria y en las reacciones al azar en las que no hay obligatoriedad en la secuencia vinculante.

En las enzimas que siguen un mecanismo secuencial ordenado los sustratos A y B se unen a la enzima, y los productos P y Q son puestos en libertad en una determinada secuencia. Inicialmente los dos sustratos se unen a la enzima para formar un complejo central sustrato-enzima, seguidamente el complejo enzima

sustrato es convertido en un complejo central producto-enzima; y finalmente los productos son liberados. Es un mecanismo sencillo, pero la secuencia de reacciones puede ser bastante compleja, sobre todo en reacciones enzimáticas con más de dos sustratos y productos (Fig. 3).



Figura 3. Representación del Mecanismo Secuencial Ordenado Bi Bi (Cleland., 1963)

1.2.2. Mecanismo Ping Pong

Las reacciones Ping-pong son aquellas en las que al menos un producto (P, Q) es liberado antes de que todos los sustratos (A, B) se hayan unido (Fig. 4). Para la reacción de alcoholisis, este mecanismo comprende dos etapas: inicialmente se realiza un ataque nucleofílico al sustrato sobre el enlace éster por el átomo de oxígeno perteneciente al grupo hidroxilo de la serina, dando como resultado la formación de un complejo enzimático acilado y la liberación de un grupo alcohol del sustrato original. Finalmente se realiza la hidrólisis del complejo enzimático acilado que da como resultado la formación del producto y la regeneración de la enzima. [Walsh; 1998].

Según lo reportado por varios investigadores el mecanismo Ordenado Bi Bi se asume principalmente para las reacciones de esterificación enzimática, mientras que para las reacciones de alcoholisis se asume un mecanismo Ping Pong Bi Bi debido a que en ella se da el desplazamiento de un grupo acil⁶ entre un acilglicerol y un alcohol.

⁶ grupo derivado de un oxoácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo.

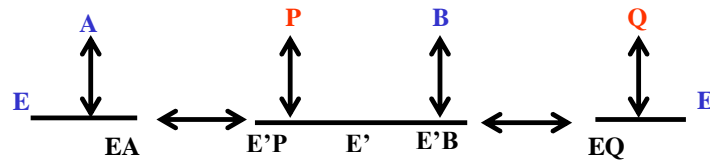


Figura 4. Representación del Mecanismo Ping Pong Bi Bi (Cleland., 1963)

El mecanismo de la reacción de alcoholisis catalizada por lipasas inmovilizadas para sistemas complejos (aceites vegetales y alcoholes terpénicos) han sido poco estudiado y en su mayoría comprende el uso de sustratos de baja complejidad como ésteres, triacilglicéridos y alcoholes de naturaleza alifática [Paiva y col., 2002; Pilarek y col., 2007]. Dentro de los estudios reportados para los sistemas complejos se encuentran los realizados por Al-Zuhair., 2005; Xu y col., 2005; Torres y col., 2007; Al-Zuhair y col., 2007; los cuales usaron aceite de girasol/metanol, aceite de soya refinado/metil acetato, aceite de oliva/etanol y aceite de palma/ metanol respectivamente concluyendo que el mecanismo de reacción Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol es el que mejor describe estos sistemas a excepción del trabajo reportado por Torres y col., 2007; el cual describe su sistema a través de un modelo Uni respuesta derivado del mecanismo generalizado de Michaelis – Menten (Anexos 4 y 5)

1.3 Diseño básico del reactor enzimático sobre condiciones ideales

El diseño básico y la evaluación de desempeño de un reactor enzimático se refieren a las condiciones ideales de operación del reactor. Estas se alcanzan para un reactor de tanque agitado o un reactor tipo batch o por lotes (CSTR y BSTR respectivamente), cuando la mezcla de reacción es homogénea en sus propiedades de concentración (mezcla completa). Para el reactor de lecho empacado (CPBR), las condiciones ideales se definen al manejar flujos con régimen tipo flujo pistón. También es importante el control de las variables operacionales como el pH y la temperatura y la actividad de la enzima ya que

deben ser constantes a lo largo de la operación. Las limitaciones de transferencia de masa deben ser negligentes en el caso de catálisis heterogénea.

La desviación del comportamiento ideal puede ser producida debido a patrones de flujo no ideal (mezcla incompleta en el caso de los reactores de tanque agitado), operaciones no isotérmicas debidas a las limitaciones en la transferencia de calor, variaciones en el pH debido a la falta de control y mezcla de la reacción, perdidas del catalizador durante la operación debidas a la inactivación térmica o la elución del soporte si es inmovilizado y la presencia de restricciones difusionales en el caso de la catálisis heterogénea.

Teniendo en cuenta las anteriores condiciones, el diseño básico de la operación de un reactor enzimático continuo o por lotes, se presenta inicialmente como un estudio preliminar al estudio de los efectos de la inactivación enzimática y el estudio de las limitaciones de transferencia de masa. En conclusión, un diseño básico que describa la operación de un reactor enzimático está constituido por un balance de materia del proceso y una expresión cinética adecuada expresada en función de la conversión, X.

La conversión es definida de acuerdo a las ecuaciones 1, 2, 3 y 4.

$$X = \frac{(s_i - s)}{s} = \frac{np}{s_i} \quad (1)$$

Donde, s_i es igual a la concentración molar inicial del sustrato y s es igual a la concentración molar del sustrato. En el caso de las reacciones equimolares ($n=1$):

$$X = \frac{(s_i - s)}{s} = \frac{np}{s_i} \quad (2)$$

$$s = s_i(1 - X) \quad (3)$$

$$p = s_i(X) \quad (4)$$

1.3.1 Reactor enzimático por lotes.

Los reactores por lotes presentan una operación discontinua, donde el reactor es llenado con el medio de reacción ajustado a las condiciones de operación; luego la enzima es agregada y la reacción procede hasta que se obtiene el nivel de conversión deseado. Finalmente, la enzima que se encuentra disuelta en el medio de reacción, es inactivada, para llevar a cabo el vaciado del reactor e iniciar un nuevo proceso.

Para el diseño básico de un reactor enzimático por lotes, el balance de materia y la expresión cinética de la reacción que sigue un mecanismo Ping Pong Bi Bi se define por las ecuaciones 5 -8.

$$v(e, X) = -\frac{ds}{dt} = s_i \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

$$\int_0^X \frac{dX}{v(e, X)} = \int_0^t \frac{dt}{a_i} \quad (6)$$

$$\int_0^X \frac{dX}{v(e, X)} = \int_0^t \frac{dt}{b_i} \quad (7)$$

$$v_i = \frac{k_{cat} e a b}{a b + K_{mA} a + K_{mTG} K_{mA}} \quad (8)$$

En el caso del mecanismo Ping Pong Bi Bi limitado por el sustrato A, se deben definir las concentraciones molares de los sustratos en función de la conversión como se muestra en las ecuaciones 9 y 10. Al definir el mecanismo Ping Pong Bi Bi limitado por el sustrato B (triacilglicéridos) se deben tener en cuenta las ecuaciones 11 y 12.

$$a = a_i(1 - X) \quad (9)$$

$$b = b_i - a_iX \quad (10)$$

$$b = b_i(1 - X) \quad (11)$$

$$a = a_i - b_iX \quad (12)$$

Al remplazar las ecuaciones 15 y 17 con las expresiones cinéticas (ecuaciones 13 y 14), obtenemos las expresiones necesarias para modelar un reactor (ecuaciones 16 y 18)

$$v = \frac{k_{cat}(e)(a_i(1-X))(b_i - a_iX)}{(a_i(1-X))(b_i - a_iX) + K_{mA}(a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (13)$$

$$v = \frac{k_{cat}(e)(a_i - b_iX)(b_i(1-X))}{(a_i - b_iX)(b_i(1-X)) + K_{mA}(a_i - b_iX) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (14)$$

$$\int_0^X \frac{(a_i(1-X))(b_i - a_iX) + K_{mA}(a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i(1-X))(b_i - a_iX)} dX = \int_0^t \frac{k_{cat}(e)}{a_i} dt = \int_0^t \frac{m_{cat} a_s}{a_i} dt \quad (15)$$

$$X - \frac{K_{mA}}{a_i} LN\left(\frac{|a_iX - b_i|}{|b_i|}\right) - \left(\frac{K_{mTG} K_{mA}}{a_i(a_i - b_i)}\right) LN\left(\frac{|a_iX - b_i|}{LN((1-X)(|b_i|))}\right) = \frac{k_{cat}(e)}{a_i} t = \frac{m_{cat} a_s}{a_i} t \quad (16)$$

$$\int_0^X \frac{(a_i - b_iX)(b_i(1-X)) + K_{mA}(a_i - b_iX) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i - b_iX)(b_i(1-X))} dX = \int_0^t \frac{k_{cat}(e) dt}{b_i} = \int_0^t \frac{m_{cat} a_s}{b_i} dt \quad (17)$$

$$X - \frac{K_{mA}}{a_i} \frac{LN(1-X)}{b_i} + K_{mTG} K_{mA} \left(\frac{LN(|a_i - Xb_i|)}{b_i a_i - b_i^2} \right) = \frac{k_{cat}(e)}{b_i} t = \frac{m_{cat} a_s}{b_i} t \quad (18)$$

1.3.2 Reactor de lecho empacado

Asumiendo un régimen de flujo pistón para el lecho catalítico, el balance de material en estado estable y las expresiones cinéticas para el reactor de lecho empacado se definen por las ecuaciones 19 – 24.

- ✓ Balance de materia y expresión de velocidad para el sustrato A.

$$F a_i|_z - F a_i|_{z+\Delta z} = v \Delta V_R \varepsilon \quad (19)$$

$$F a_i(1 - X) - F a_i[1 - (X - \Delta X)] = v \Delta V_R \varepsilon \quad (20)$$

$$\int_0^X \frac{dX}{v(e,X)} = \frac{\tau}{a_i} \quad (21)$$

- ✓ Balance de materia y expresión de velocidad para el sustrato A.

$$F b_i|_z - F b_i|_{z+\Delta z} = v \Delta V_R \varepsilon \quad (22)$$

$$F b_i(1 - X) - F b_i[1 - (X - \Delta X)] = v \Delta V_R \varepsilon \quad (23)$$

$$\int_0^X \frac{dX}{v(e,X)} = \frac{\tau}{b_i} \quad (24)$$

El desarrollo en función de la conversión de las ecuaciones de velocidad se describe a través de las ecuaciones 25 - 35

$$v_i = \frac{k_{cat} e a b}{a b + K_{mA} a + K_{mTG} K_{mA}} \quad (25)$$

$$a = a_i(1 - X) \quad (26)$$

$$b = b_i - a_i X \quad (27)$$

$$v = \frac{k_{cat} (e)(a_i(1-X))(b_i - a_i X)}{(a_i(1-X))(b_i - a_i X) + K_{mA} (a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (28)$$

$$\int_0^X \frac{(a_i(1-X))(b_i - a_i X) + K_{mA} (a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i(1-X))(b_i - a_i X)} dX = \frac{k_{cat} (e)}{a_i} \tau \quad (29)$$

$$X - \frac{K_{mA}}{a_i} \text{LN} \left(\frac{|a_i X - b_i|}{|b_i|} \right) - \left(\frac{K_{mTG} K_{mA}}{a_i(a_i - b_i)} \right) \text{LN} \left(\frac{|a_i X - b_i|}{\text{LN}(|X-1|)(|b_i|)} \right) = \frac{k_{cat} (e)}{a_i} \tau = \frac{k_{cat} E}{F a_i} = \frac{M_{cat} a_s}{F a_i} \quad (30)$$

$$b = b_i(1 - X) \quad (31)$$

$$a = a_i - b_i X \quad (32)$$

$$v = \frac{k_{cat} (e)(a_i - b_i X)(b_i(1 - X))}{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X)) + K_{mA} (a_i - b_i X) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (33)$$

$$\int_0^X \frac{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X)) + K_{mA} (a_i - b_i X) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X))} dX = \frac{k_{cat} (e)}{a_i} \tau \quad (34)$$

$$X - \frac{K_{mA}}{a_i} \frac{\text{LN}(|X-1|)}{b_i} + K_{mTG} K_{mA} \left(\frac{\text{LN}(|a_i - X b_i|)}{\frac{\text{LN}(|X-1|)(|a_i|)}{b_i a_i - b_i^2}} \right) = \frac{k_{cat} (e)}{b_i} \tau = \frac{k_{cat} E}{F b_i} = \frac{M_{cat} a_s}{F b_i} \quad (35)$$

1.3.3 Reactor de tanque agitado

Asumiendo mezcla completa, el balance de material en estado estable y las expresiones cinéticas para el reactor de tanque agitado se definen por las ecuaciones 36 – 41.

- ✓ Balance de materia y expresión de velocidad para el sustrato A.

$$F a_i|_{entrada} - F a_i|_{salida} = v \Delta V_R \varepsilon \quad (36)$$

$$F a_i - F a_i(1 - X) = v \Delta V_R \varepsilon \quad (37)$$

$$\frac{X}{v(e,X)} = \frac{\tau}{a_i} \quad (38)$$

- ✓ Balance de materia y expresión de velocidad para el sustrato B.

$$F b_i|_{entrada} - F b_i|_{salida} = v \Delta V_R \varepsilon \quad (39)$$

$$F b_i - F b_i(1 - X) = v \Delta V_R \varepsilon \quad (40)$$

$$\frac{X}{v(e,X)} = \frac{\tau}{b_i} \quad (41)$$

El desarrollo en función de la conversión de las ecuaciones de velocidad se describe a través de las ecuaciones 42 – 50.

$$v_i = \frac{k_{cat} e a b}{a b + K_{mA} a + K_{mTG} K_{mA}} \quad (42)$$

$$a = a_i(1 - X) \quad (43)$$

$$b = b_i - a_i X \quad (44)$$

$$v = \frac{k_{cat} (e)(a_i(1-X))(b_i - a_i X)}{(a_i(1-X))(b_i - a_i X) + K_{mA} (a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (45)$$

$$X \left[\frac{(a_i(1-X))(b_i - a_i X) + K_{mA} (a_i(1-X)) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i(1-X))(b_i - a_i X)} \right] = \frac{k_{cat} (e)}{a_i} \tau = \frac{k_{cat} E}{F a_i} = \frac{M_{cat} a_s}{F a_i} \quad (46)$$

$$b = b_i(1 - X) \quad (47)$$

$$a = a_i - b_i X \quad (48)$$

$$v = \frac{k_{cat} (e)(a_i - b_i X)(b_i(1 - X))}{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X)) + K_{mA} (a_i - b_i X) + K_{mTG} K_{mA}} \quad (49)$$

$$X \left[\frac{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X)) + K_{mA} (a_i - b_i X) + K_{mTG} K_{mA}}{(a_i - b_i X)(b_i(1 - X))} \right] = \frac{k_{cat} (e)}{b_i} \tau = \frac{k_{cat} E}{F b_i} = \frac{M_{cat} a_s}{F b_i} \quad (50)$$

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

El citronelol fue obtenido de Merck, y aceite de palmiste refinado grado comestible RDB de C.I. Santandereana de Aceites –C.I. SACEITES S.A.-. Los demás reactivos empleados y los solventes necesarios para los análisis grado GC o HPLC fueron grado analítico

2.1.2 Enzimas

Las enzimas lipasas 1,3-estereoespecíficas de *Mucor miehei* (Lipozyme[®] IM inmovilizada en una resina de intercambio iónico) y *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme[®] TL inmovilizada en sílica gel) se adquirieron a Novozymes; la lipasa QLC de *Alcaligenes sp.* (Inmovilizada en tierra de *diatomácea*) y la lipasa QLG de *Alcaligenes sp.* fueron obtenidas de Meito Sangyo Co., Ltda.

2.2 Desarrollo experimental

La investigación se desarrolló en tres etapas. En la primera, se realizó un screening de cuatro lipasas para determinar su desempeño en la reacción de alcoholisis, evaluando la actividad esterificante y la actividad hidrolítica de las enzimas. Adicionalmente, se evaluó la producción de ésteres de citronelol en un sistema libre de solvente. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la lipasa con mayor potencial en la producción de estos compuestos.

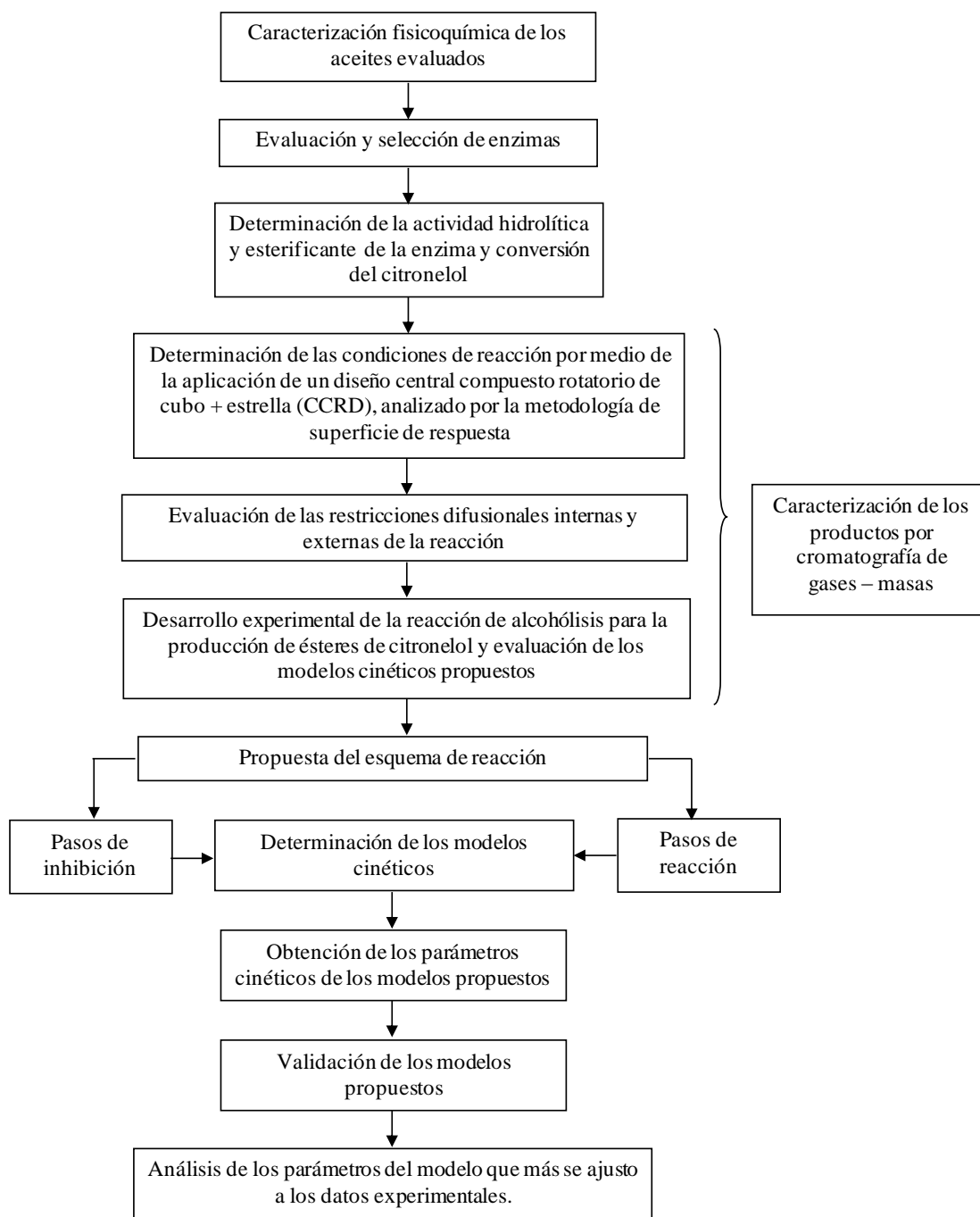


Figura 5. Diagrama de bloques del desarrollo experimental

En la segunda etapa, se realizó la determinación de las condiciones de reacción por medio de la aplicación de un diseño central compuesto rotatorio de cubo + estrella 2^3 (CCRD), analizado por la metodología de superficie de respuesta y la

evaluación de las restricciones difusionales internas y externas de la reacción, en presencia de la lipasa seleccionada previamente que en este caso correspondió a Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus*.

En la tercera etapa, la reacción de alcoholólisis fue replicada a escala de laboratorio para tres sistemas de reacción (aceite de palmiste/citronelol, aceite de palmiste hidrogenado/citronelol y aceite de palma hidrogenado/citronelol), para la obtención de los datos experimentales necesarios para evaluar los modelos Cinéticos, Mecanismo Ping Pong Bi Bi y Mecanismo Ordenado Bi Bi.

En la Figura 5, se presenta un resumen de la metodología experimental.

2.2.1 Alcoholólisis enzimática.

En todas las reacciones de alcoholólisis se emplearon como sustratos aceite de palmiste, aceite de palmiste hidrogenado, aceite de palma hidrogenado y citronelol. En tubos de ensayo de 50 mL provistos con tapa se mezclaron el aceite seleccionado (1-2 g) y el alcohol (0,2-1 mL) dependiendo de la relación de sustratos indicada en el diseño experimental. Esta mezcla se incubó en un baño termostataado a la temperatura evaluada y empleando agitación orbital de 250 rpm. Luego de 15 minutos de agitación se agregó la lipasa inmovilizada (20-100 mg). A partir de este momento se inició el cálculo del tiempo y una vez transcurrido, la enzima se separó del producto por filtración. El filtrado se recogió en tubo de ensayo, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró nuevamente. Del segundo filtrado obtenido se pesaron con exactitud entre 10-15 mg para la determinación de sus componentes (ésteres grasos y acilglicerol) por cromatografía de gases.

Los ésteres de citronelol formados se extrajeron siguiendo el método descrito por Abigor y col., 2000. Inicialmente se tomaron 250 μ L de la mezcla reaccionante

que se trataron con 4 volúmenes de hexano/éter (1:1, v/v) y dos volúmenes de cloruro de sodio saturado. La solución se agitó por medio 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, filtradas en lana de vidrio. De esta solución se tomaron 150 μL para su respectivo análisis por cromatografía de gases CG-FID.

ETAPA I

2.2.2 Screening de lipasas

Las enzimas fueron utilizadas en la reacción de alcoholisis en las condiciones señaladas en la Tabla 1, que corresponden a las recomendadas por los proveedores. A cada una de ellas se les midió además la actividad esterificante y la actividad hidrolítica, siguiendo la metodología descrita en el apartado métodos de análisis (2.3) La selección de la enzima se realizó teniendo como base el resultado de la conversión del citronelol a ésteres de citronelol y las actividades que presentan.

ETAPA II

2.2.3 Evaluación de las restricciones difusionales

En el estudio las restricciones difusionales internas se evaluó la presencia de gradientes de concentración en la intrafase, empleando partículas de biocatalizador de diferentes tamaños (D_{pi} , $D_{pi}/2$, $D_{pi}/3$, $D_{pi}/4$). Para la obtención de las fracciones de biocatalizador necesarias para el experimento se realizó el tamizado de la enzima. De igual manera, se realizó el estudio de las restricciones

difusionales externas utilizando el catalizador con tamaño de partícula 0.6 mm, los experimentos se efectuaron por triplicado a temperatura constante en diversas velocidades de agitación (100 rpm, 200 rpm, 300 rpm).

Tabla 1. Diseño experimental aplicado para la selección de la enzima en la reacción de alcoholisis

Enzima	Temperatura °C	Tiempo (horas)
Lipozyme TL IM (<i>Thermomyces Lanuginosus</i>)	40	3
Lipozyme TL IM (<i>Thermomyces Lanuginosus</i>)	40	6
Lipozyme TL IM (<i>Thermomyces Lanuginosus</i>)	60	6
Lipozyme TL IM (<i>Thermomyces Lanuginosus</i>)	60	3
Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehie</i>)	40	3
Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehie</i>)	40	6
Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehie</i>)	60	6
Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehie</i>)	60	3
Lipasa QLG (<i>Alcaligenes sp.</i> inmovilizada)	40	3
Lipasa QLG (<i>Alcaligenes sp.</i> inmovilizada)	40	6
Lipasa QLG (<i>Alcaligenes sp.</i> inmovilizada)	60	6
Lipasa QLG (<i>Alcaligenes sp.</i> inmovilizada)	60	3
Lipasa QL (<i>Alcaligenes sp.</i> cruda)	40	3
Lipasa QL (<i>Alcaligenes sp.</i> cruda)	40	6
Lipasa QL (<i>Alcaligenes sp.</i> cruda)	60	6
Lipasa QL (<i>Alcaligenes sp.</i> cruda)	60	3

2.2.4 Determinación de las condiciones óptimas

En la etapa de optimización de variables se empleó la enzima Lipozyme TL IM en medio libre de solvente siguiendo la metodología descrita en el numeral 2.21. Se aplicó un diseño central compuesto 2^3 más estrella de tres niveles por tres variables, usando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVI para Windows. Las variables independientes estudiadas fueron: temperatura X_1 ($^{\circ}\text{C}$) cantidad de enzima, X_2 (porcentaje en peso con respecto al peso del aceite); relación alcohol/aceite, X_3 (mol/mol). Los niveles empleados para cada variable se presentan en la Tabla 2. La variable dependiente o de respuesta (Y_1), fue la conversión de citronelol (%). Cada experimento se realizó por duplicado en todos los puntos obteniendo un total de 46 experimentos (Tabla 9, sección de resultados).

Tabla 2. Variables independientes y niveles del diseño

Variable independiente	Niveles		
	-1	0	1
Temperatura $^{\circ}\text{C}$	40	50	60
Cantidad de enzima (Porcentaje en peso con respecto al aceite)	3	6	9
Relación de sustratos aceite/alcohol	3.0	3.5	4.0

En el estudio se mantuvieron constantes parámetros tales como el tiempo de la reacción (3 horas) y la velocidad de agitación orbital (250 rpm). Los intervalos en los cuales se evaluaron las variables de estudio así como los valores de los parámetros que se mantuvieron constantes se eligieron con base en las investigaciones hechas por Mittelbach., 1990; Selmi y col., 1998; Abigor y col., 2000; Iso y col., 2001

ETAPA III.

2.2.5 Evaluación de la cinética de la reacción.

Como la reacción se llevó a cabo en ausencia de solvente, no es posible fijar la concentración de un sustrato y cambiar la concentración del otro.

Tabla 3. Diseño experimental para el estudio cinético

N°.	Gramos Aceite	Relaciones molares (Aceite: Alcohol)	Molaridad Aceite (mol/L)	Molaridad Citronelol (mol/L)
1	0,6	1: 25,9	0,184	4,754
2	0,8	1: 18,3	0,246	4,500
3	1	1: 13,6	0,311	4,233
4	1,2	1: 10,7	0,372	3,984
5	1,4	1: 8,5	0,437	3,718
6	1,6	1: 6,8	0,506	3,439
7	1,8	1: 5,6	0,568	3,184
8	2	1: 4,6	0,634	2,916
9	2,2	1: 3,7	0,707	2,617
10	2,4	1: 3	0,777	2,332
11	2,6	1: 2,45	0,843	2,065
12	2,8	1: 1,95	0,913	1,780
13	3	1: 1,5	0,986	1,479
14	3,2	1: 1,15	1,052	1,210
15	3,4	1: 0,8	1,128	0,902
16	3,6	1: 0,5	1,201	0,601
17	3,8	1: 0,25	1,271	0,318
18	4	1: 0,0125	1,345	0,017

Por lo tanto, fue necesario mezclar los dos sustratos en diversas relaciones, manteniendo el peso total de los mismos en un valor fijo de 2 gramos.

Para esta etapa se aplicó el diseño experimental relacionado en la tabla 3. Las relaciones molares aceite alcohol se escogieron con base en los trabajos de Du y col, 2004; Serri y Kamaruddin., 2006; Al-Zuhair y col, 2007.

Con base en los resultados obtenidos y siguiendo el procedimiento mostrado en la Figura 4 se evaluaron los modelos que se describen a continuación. De esta forma, se determinaron los parámetros cinéticos para la reacción de alcoholísis.

Las ecuaciones simplificadas que se propusieron para este estudio fueron:

Mecanismo Ping Pong Bi Bi [Bezbradica y col; 2007]

$$V_i = \frac{V_{\max} [TG][A]}{K_{mTG} [A] + K_{mA} [TG] + [TG][A]} \quad (51)$$

Mecanismo Ordenado Bi Bi [Illanes y col; 2008]

$$V_i = \frac{V_{\max} [TG][A]}{K_{mTG} K_{mA} + [TG][A] + K_{mA} [TG]} \quad (52)$$

Mecanismo Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol [Dossat y col., 2002]

$$V_i = \frac{V_{\max} [TG][A]}{K_{mTG} [A] (1 + ([A]/K_i)) + K_{mA} [TG] + [TG][A]} \quad (53)$$

Mecanismo Ordenado Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol [Bezbradica y col; 2006]

$$V_i = \frac{V_{\max} [TG][A]}{K_{mTG} K_{mA} + [TG][A] + K_{mA} [TG] + K_{mTG} [A] + \frac{K_{mTG}}{K_i} [A]^2} \quad (54)$$

donde, V_i es la velocidad inicial de reacción; $[TG]$ y $[A]$ las concentraciones molares de triglicéridos y citronelol, respectivamente; K_{mTG} y K_{mA} las constantes aparentes de Michaelis para los triglicéridos y citronelol, respectivamente y V_{\max} es la velocidad inicial máxima de reacción.

Como la reacción se realiza en ausencia de solvente la concentración del triglicérido se expresó como una función de la concentración de citronelol y la densidad de la mezcla reaccionante, de esta forma las ecuaciones 51, 52, 53 y 54 se convierten en las ecuaciones 55, 56, 57 y 58 respectivamente:

$$V_i = \frac{V_{\max} [A](\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}}{K_{mTG} [A] + (K_{mA} (\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}) + [A](\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}} \quad (55)$$

$$V_i = \frac{V_{\max} (\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG} [A]}{K_{mTG} K_{mA} + ((\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}) [A] + K_{mA} ((\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG})} \quad (56)$$

$$V_i = \frac{V_{\max} [A](\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}}{K_{mTG} [A](1 + ([A] / K_i)) + (K_{mA} + [A])(\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}} \quad (57)$$

$$V_i = \frac{V_{\max} (\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG} [A]}{K_{mTG} K_{mA} + ((\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}) [A] + K_{mA} ((\rho_{mix} - M_A [A]) / M_{TG}) + K_{mTG} [A] + \frac{K_{mTG}}{K_i} [A]^2} \quad (58)$$

donde, ρ_{mix} es la densidad de la mezcla reaccionante, y M_A y M_{TG} los pesos moleculares del citronelol y del triglicérido promedio. La medida de las densidades se realizó utilizando picnómetro.

Para realizar la modelización de la reacción de alcoholisis se calcularon las velocidades iniciales de reacción para determinadas relaciones molares, los valores obtenidos se utilizaron para simular la curva cinética utilizando el software Polymath Professional versión 6.1, en el cual se usó una regresión no lineal por el método de Levenberg – Marquardt con doble precisión.

2.3 Métodos de análisis

2.3.1 Determinación de la actividad hidrolítica (lipolítica) de la enzima

Su determinación se llevó a cabo utilizando una adaptación del método descrito por Moreno., 2001. El sustrato se preparó emulsionando una cantidad fija de aceite de palmiste (500 mg) con 9,5 mL de cloruro de sodio (0.89 % w/v) y 500 mg de goma Xanthan, agitando la mezcla en un tubo de ensayo durante cinco minutos a temperatura ambiente. Luego se tomaron 20 mL de la emulsión del sustrato y se agregaron 20 mL de una solución de cloruro de sodio (0.89 % w/v), hasta completar un volumen 40 mL. El pH se ajustó a 8.0 con NaOH 10 mM, y finalmente se agregó una cantidad fija de lipasa. La mezcla se incubó a 55 °C con agitación constante en un vaso de 100 mL. Los ácidos grasos liberados fueron monitoreados continuamente en un valorador automático en modo pH-stato, por titulación con NaOH 10 mM, manteniendo constante el pH a 8,0. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. La actividad se define como la cantidad de la misma que cataliza la formación de 1 μmol de producto en 1 minuto.

2.3.2 Determinación de la actividad esterificante.

La evaluación de la actividad esterificante se realizó con base en el método reportado por Kiran y col., 2000. Se empleó una solución stock que contenía 1.57 mL de ácido butírico (0.16 M) y 3.14 mL de butanol (0.33 M) aforados a 100 mL con heptano. Los experimentos con cada lipasa se llevaron a cabo en tubos de ensayo con una capacidad de 50 mL y tapa rosca, estos contenían 3 mL de la solución stock con la cantidad apropiada de enzima (2.2 mg - 3.0 mg). Los tubos se incubaron en un baño termostataado agitado a una temperatura de 60 °C alrededor de 120 minutos. Después de cada periodo el contenido de los tubos fue directamente titulado, después de agregar 1 mL de metanol, con NaOH 0.02 N. El blanco con 3 mL de la solución stock en un tubo de ensayo con tapa rosca y sin la enzima se tituló como se mencionó anteriormente para determinar el contenido de ácidos totales en la mezcla de reacción. La actividad esterificante fue determinada por la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad esterificante} = \frac{V \times M \times 100}{E \times T} \text{ unidades} \quad (59)$$

donde, V es la diferencia en volumen en mL de NaOH entre el blanco y las muestras después del tiempo T (periodo de incubación en minutos), y corresponde a la medida del ácido butírico consumido debido a la esterificación, M es la molaridad del NaOH y E es la cantidad de enzima empleada en mg. Todos los ensayos se llevaron a cabo cinco veces. Una unidad de actividad esterificante es definida como 1 μmol de ácido butírico consumido en la reacción de esterificación por minuto por miligramo de lipasa.

2.3.3 Análisis de ácidos grasos

La preparación de metil ésteres de los ácidos grasos se realizó siguiendo la metodología descrita por Moreno y col., (2001) mientras que su identificación y cuantificación se realizó según la norma NTC 5013, utilizando un cromatógrafo Agilent HP 6890 Plus con detector FID, con columna DB-WAX (30m x 0.32 mm x 0.25 μ m) y la siguiente programación de temperatura: 120°C - 250°C (4 min) a 14°C/min. Las demás condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector 250 °C en modo split con relación 100:1, gas de arrastre (Helio) a 1,7 mL/min, temperatura del detector 270°C, flujo de aire 400 mL/min, flujo de hidrógeno 40 mL/min, flujo del gas make-up (helio): 38,2 mL/min. Par la identificación se utilizó un patrón de FAMES analizado bajo las mismas condiciones: *Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1 AMP. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo.

2.3.4 Análisis de ésteres de citronelol.

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. Previamente fue necesario estandarizar el método determinando las figuras de merito, teniendo en cuenta que no existen patrones para los ésteres de citronelol (datos no mostrados).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Previo al desarrollo del diseño experimental se determinó la composición de los ácidos grasos del aceite de palmiste, el aceite de palma hidrogenado y el aceite de palmiste hidrogenado. Se encontró que los componentes mayoritarios del aceite de palmiste y palmiste hidrogenado son el ácido láurico (47%) y el ácido mirístico (16%), mientras que en el aceite de palma hidrogenado los componentes mayoritarios son el ácido palmítico (48 %) y el ácido esteárico (49 %) (Tabla 4).

Tabla 4. Composición (%) de ácidos grasos de los diferentes sustratos empleados en la reacción de alcoholisis

Nombre	Fórmula	Ácidos grasos	PKO	PKOH	POH
Ácido octanoico	$C_8H_{16}O_2$	Caprílico	3,00	3,30	0,30
Ácido decanoico	$C_{10}H_{20}O_2$	Capríco	3,40	3,20	0,00
Ácido dodecanoico	$C_{12}H_{24}O_2$	Láurico	47,50	47,70	0,30
Ácido tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$	Mirístico	15,20	16,90	1,00
Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	Palmítico	11,30	8,30	48,20
Ácido octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$	Esteárico	2,60	16,60	49,30
ácido cis-9-octadecenoico 18:1 cis-9	$C_{18}H_{34}O_2$	Oleico	14,80	3,70	0,00
Ácido cis-9, cis-12-octadecadienoico 18:2 (n-6)	$C_{18}H_{32}O_2$	Linoleico	2,20	0,10	0,40
Ácido eicosatetraenoico	$C_{20}H_{32}O_2$	Araquidónico	0,00	0,20	0,50

PKO: Aceite de palmiste. PKOH: Aceite de palmiste hidrogenado POH: Aceite de palmiste hidrogenado

Con estos resultados se estableció que el peso molecular promedio de un triacilglicérido de aceite de palmiste es de 711,8 g/mol, mientras que el de un triglicérido de aceite de palmiste hidrogenado y de aceite de palma hidrogenado es de 710,9 g/mol y 845,7 g/mol respectivamente. Estos valores son esenciales para fijar las relaciones alcohol/aceite en la reacción de alcoholísis.

ETAPA I

3.1 Screening de lipasas

Para la evaluación de las lipasas comerciales se determinó la actividad esterificante y la actividad hidrolítica, además de la conversión de citronelol a ésteres de citronelol. En el anexo 1, se presentan las curvas de valoración con las cuales se calculó la actividad hidrolítica de las enzimas empleando una regresión polinómica para obtener la pendiente de la tangente a la curva en el tiempo cero, cuyo valor representa la actividad buscada.

En la Tabla 5 se relacionan los resultados obtenidos y se observa que la enzima Lipozyme TL IM presenta el mayor valor de actividad esterificante y la mayor actividad hidrolítica seguida de la lipasa QL que no se encuentra inmovilizada (anexo 2).

La actividad hidrolítica de las lipasas está directamente correlacionada con su actividad en síntesis pero es independiente de su actividad en las reacciones de transesterificación. Sin embargo, es recomendable que la lipasa presente una alta actividad hidrolítica ya que en la reacción de alcoholísis se dan las reacciones de hidrólisis y de síntesis sucesivamente [Forjan y col., 2000].

Tabla 5. Actividad esterificante de las lipasas

Enzima	Actividad esterificante	Actividad hidrolítica
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de lipasa	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de lipasa
Lipozyme TL IM	0,014 \pm 4,94E-05	1,180 \pm 0,05
Lipozyme RM IM	0,010 \pm 1,54E-05	0,191 \pm 0,03
Lipasa QLG	0,009 \pm 0,0002	0,324 \pm 0,04
Lipasa QL	0,012 \pm 0,0003	0,697 \pm 0,04

La evaluación de las lipasas en cuanto a la producción de ésteres de citronelol se efectuó aplicando un diseño experimental para dos variables (temperatura y tiempo de reacción) a dos niveles, tomando como base los datos suministrados por los proveedores. En la Tabla 6, se muestran las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos y la conversión del citronelol (%) en cada una de las reacciones.

Tabla 6. Diseño experimental para screening de lipasas.

Parámetros		Enzimas			
Temperatura	Tiempo	Lipozyme TL IM	Lipozyme RM IM	Lipasa QLG	Lipasa QL
°C	Horas	Conversión a citronelol (%)	Conversión a citronelol (%)	Conversión a citronelol (%)	Conversión a citronelol (%)
40	3	60,24	64,82	45,28	82,88
40	6	76,20	74,16	76,87	76,34
60	3	71,90	61,18	53,80	73,00
60	6	84,71	87,83	89,06	56,80

De acuerdo a la Figura 6, a una temperatura de 40 °C en un tiempo de reacción de 3 horas, la enzima más activa es la Lipozyme QL alcanzando un valor máximo de conversión de citronelol de 76,3%; mientras que dentro de las enzimas inmovilizadas los mayores valores se alcanzan con las Lipasas RM IM y TL IM. A la misma temperatura de reacción y por un lapso de 6 horas la enzima más activa fue la Lipasa QL con un valor de conversión de citronelol de 82,88 %.

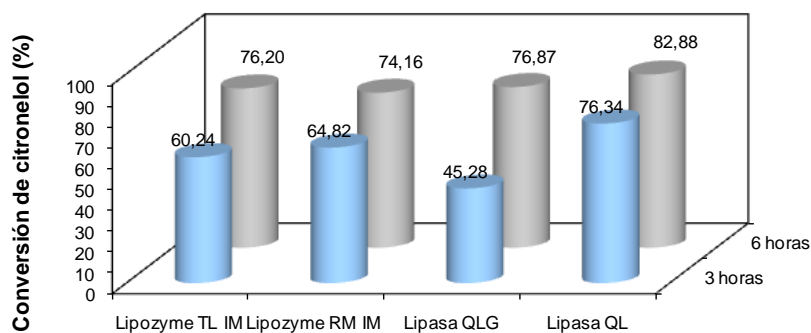


Figura 6. Screening de lipasas a 40 °C en un sistema libre de solvente

A 60 °C y 6 horas de reacción las tres enzimas inmovilizadas presentan altos niveles de conversión de citronelol. Sin embargo, la enzima Lipasa QL disminuye su porcentaje de conversión de citronelol a 73 % a esta temperatura. (Fig. 7). En cuanto a los costos se encontró que la enzima más económica es la Lipozyme TL IM, seguida de la Lipozyme RM IM, ambas producidas comercialmente por Novozyme. Las enzimas de Meito Sangyo Co., Ltd. resultaron ser más costosas y su consecución no es fácil. Basados en la actividad hidrolítica y esterificante junto con las anteriores consideraciones se seleccionó la enzima Lipozyme TL IM. (Anexo 2).

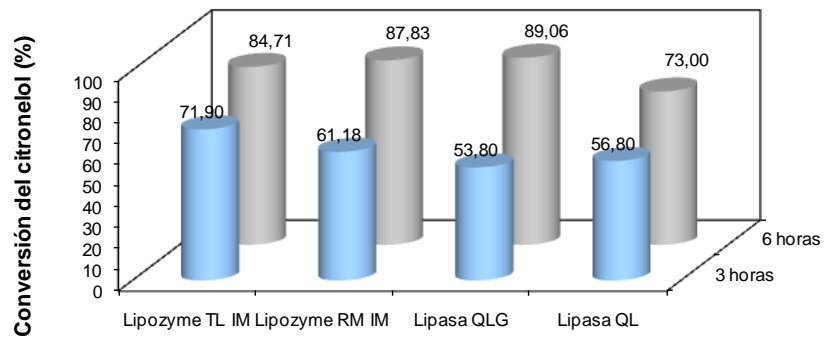


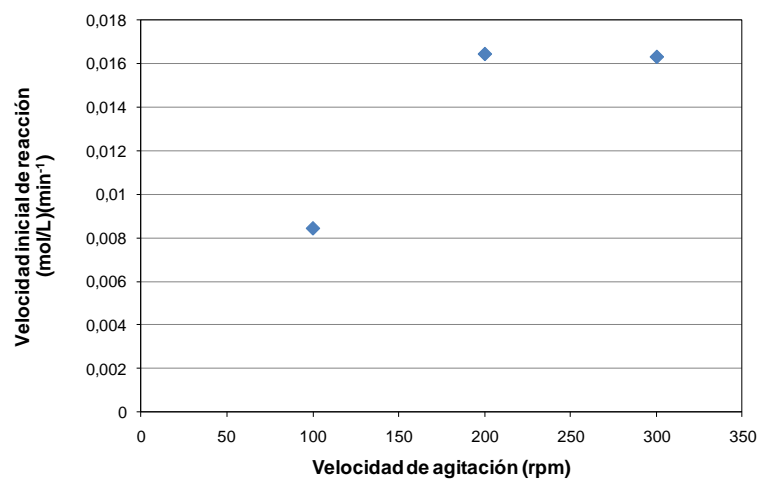
Figura 7. Screening de lipasas a 60 °C en un sistema libre de solvente

ETAPA II

3.2 Restricciones difusionales

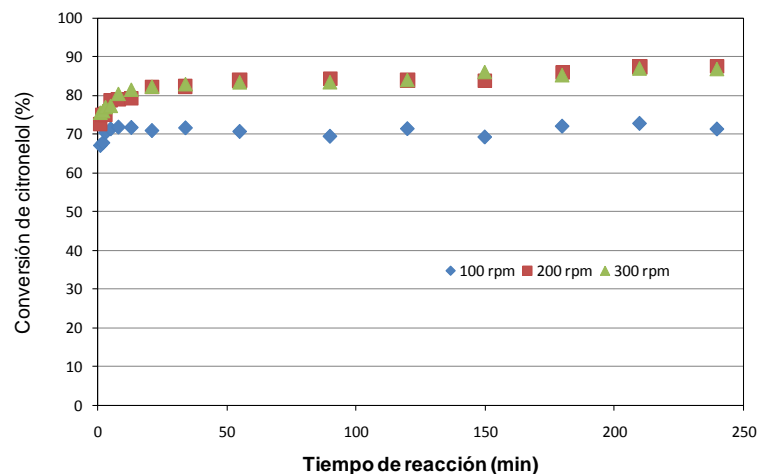
Para la determinación de las restricciones difusionales externas se aplicó el test de agitación [Perego y Peratello; 1999], descrito en el numeral 2.2.4.

Figura 8a. Influencia de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de reacción



Como se observa en la Figura 8a la velocidad inicial de reacción aumenta al incrementa la velocidad de agitación entre 100 y 200 rpm; entre 200 y 300 rpm la velocidad inicial de reacción se mantiene invariable indicando que las restricciones difusionales externas pueden ser reducidas usando velocidades de agitación mayores a las 200 rpm; esto se puede corroborar al evaluar la variación de la conversión del citronelol (%) en función del tiempo, en donde los puntos para las curvas de 200 y 300 rpm se superponen (Figura 8b).

Figura 8b. Influencia de la velocidad de agitación en la conversión de citronelol (%)



Para evaluar la presencia de restricciones difusionales internas, la enzima fue tamizada. En la Tabla 7, se relacionan las fracciones másicas y los rangos de diámetro de partícula obtenidos. Según el análisis diferencial por tamizado (Fig. 9), la mayor proporción de biocatalizador se encuentra en la fracción másica correspondiente al tamiz número 30 el cual presenta un diámetro de partícula promedio de 0.89 mm.

Tabla 7. Fracciones másicas de cada incremento sobre los tamices

Malla Serie Tyler	Abertura tamiz D_{pi} Mm	Fracción másica retenida x_i	Diámetro medio de las partículas en el incremento, $D_{\rho i}$, mm	Fracción acumulativa inferior a D_{pi}
16	1.180	0.00479	-	0.99521
30	0.600	0.49740	0.890	0.49780
50	0.300	0.39952	0.450	0.09828
70	0.212	0.08350	0.256	0.01478
Tapadera	0.000	0.01478	0.106	0.00000

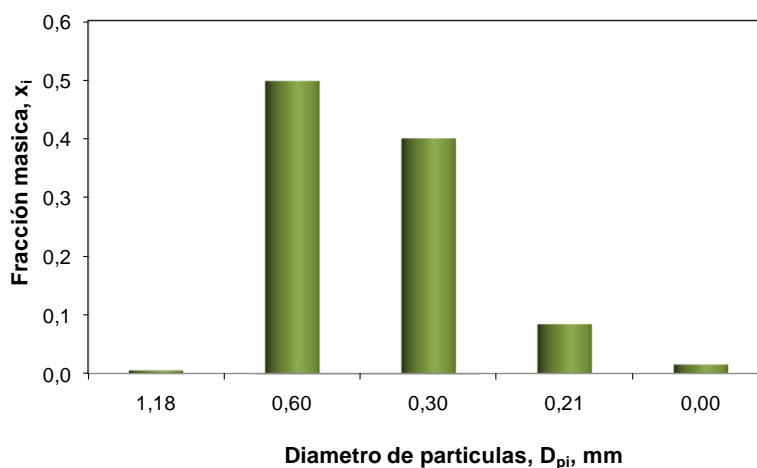


Figura 9. Análisis diferencial por tamizado

Caracterizado granulométricamente el biocatalizador por medio de análisis diferencial de tamizado, se realizó la reacción y se observó que la conversión del citronelol (%) para los distintos tamaños de biocatalizador evaluados no cambia de manera significativa (Fig. 10), indicando que el sistema está bajo control cinético químico, de forma que la enzima Lipozyme TL IM puede ser usada exactamente como es comercializada por la casa matriz.

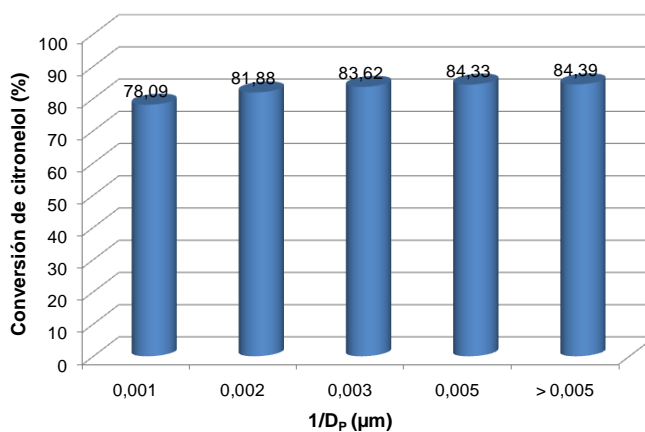


Figura 10. Test experimental para evaluar la influencia del diámetro de partícula del catalizador en la conversión.

3.3 Determinación de las condiciones óptimas

Para establecer las condiciones óptimas de la reacción de alcoholísis, se aplicó un diseño central compuesto $2^3 +$ estrella (CCRD). En la Tabla 8 se relacionan las variables independientes y los niveles del diseño; en la Tabla 9 las condiciones para llevar a cabo cada uno de los experimentos del diseño.

Variables independientes	Símbolo	Código de los niveles		
		-1	0	1
Temperatura °C	X_1	40	50	60
Cantidad de enzima (Porcentaje en peso con respecto al aceite, g)	X_2	3	6	9
Relación de sustratos molar	X_3	3,0	3,5	4,0

Tabla 9. Niveles de las variables independientes y respuestas para el diseño central compuesto $2^3 +$ estrella (CCRD) aplicado a la reacción de alcoholísis.

Experimento	Temperatura °C	Enzima (% p/p)	Relación de sustratos Aceite/alcohol [1:X]	Conversión de citronelol (%)
1	60	9	4	71,64
2	66,82	6	3,5	55,26
3	50	0,95	3,5	8,29
4	50	6	3,5	48,61
5	50	6	3,5	41,29
6	50	6	3,5	41,76
7	50	6	3,5	36,56
8	40	9	4	33,35
9	50	6	3,5	51,53
10	40	3	4	44,88
11	40	3	3	25,56
12	50	11,04	3,5	58,44
13	50	6	3,5	53,66
14	60	9	3	50,73
15	60	3	3	39,57
16	60	3	4	13,95
17	40	9	3	47,61
18	50	6	3,5	50,98
19	50	6	4,34	49,22
20	50	6	3,5	55,53
21	33,18	6	3,5	40,45
22	50	6	3,5	44,04
23	50	6	2,66	27,63

El diagrama de efectos principales que muestra la influencia negativa o positiva de cada variable en la conversión del citronelol a ésteres se muestra en la Figura 11.

La variable respuesta se presenta como función de cada factor experimental, donde el factor de interés varía desde su nivel más bajo al más alto, mientras que los otros factores permanecen constantes en sus valores centrales. En el caso de la temperatura existe una correlación positiva y directa entre esta variable y la conversión del citronelol. En el caso de las otras dos variables, aún cuando la relación es positiva, no existe una relación directa, si no que se observa un máximo cercano al nivel más alto

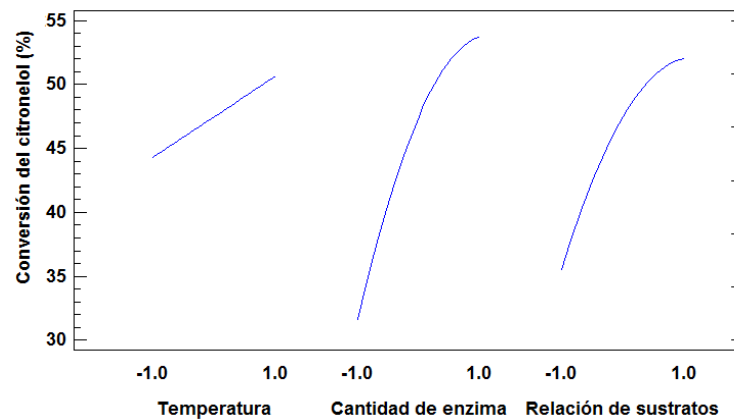


Figura 11. Diagrama de los efectos principales para Y_1 (Conversión del citronelol)

Para ver los efectos de las interacciones entre las variables los datos obtenidos se representan en el diagrama de Pareto (Figura 12), donde se muestran los efectos estimados de las variables independientes en orden decreciente de magnitud. Se encontró que la cantidad de enzima y la relación de sustratos, así como la interacción enzima-temperatura tienen efectos estadísticamente significativos sobre la variable de respuesta Y_1 (conversión de citronelol (%)) a un nivel de confianza del 95%. Una mayor cantidad de enzima representa más disponibilidad de sitios activos para interactuar con los sustratos.

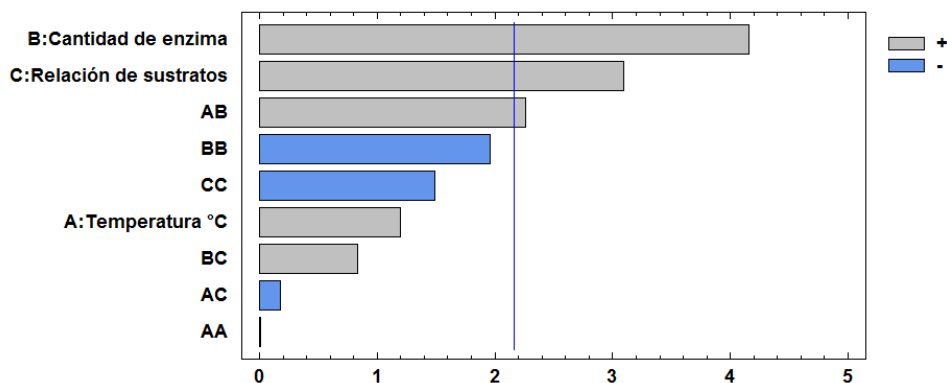


Figura 12. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta Y_1 (conversión del citrionelol (%))

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta Y_1 , se corrobora que las variables más influyentes en la reacción de alcoholisis son la cantidad de enzima, la relación de sustratos y el efecto cruzado entre la temperatura y la cantidad de enzima, estas variables poseen un valor de p (nivel de significancia) menor que 0,05 indicando que son influyentes en el proceso (Tabla 10).

Con los datos obtenidos se realizó una regresión múltiple polinómica obteniendo un modelo matemático (ecuación 60) que describe matemáticamente el proceso con la mayor precisión posible.

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 2138,29 + 152,603(X_1) + 529,972(X_2) + 394,474(X_3) + 1,18324(X_1^2) + \\
 & 376,931(X_1)(X_2) - 29,0181(X_1)(X_3) - 231,28(X_2^2) + \\
 & 139,147(X_2)(X_3) - 176,513(X_3^2)
 \end{aligned}
 \tag{60}$$

Donde, Y_1 : conversión del citrionelol (%), X_1 : Temperatura, X_2 : cantidad de enzima (%) y X_3 : relación molar alcohol/aceite. En este caso, el valor R^2 es de 0,8503 indicando que el modelo matemático explica el 85.03 % de la variabilidad de Y_1 .

Tabla 10. Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta Y_1 (conversión de citronelol (%))

Fuentes	SC ^a	GL ^b	SCM ^c	Relación F	Valor P
X_1 :Temperatura °C	318036	1	318036	1,43	0,2528
X_2 :Cantidad de enzima	3,83581E6	1	3,83581E6	17,27	0,0011
X_3 :Relación de sustratos	2,12514E6	1	2,12514E6	9,57	0,0086
AA	22,246	1	22,246	0,00	0,9922
AB	1,13662E6	1	1,13662E6	5,12	0,0414
AC	6736,41	1	6736,41	0,03	0,8644
BB	849924	1	849924	3,83	0,0722
BC	154896	1	154896	0,70	0,4187
CC	495059	1	495059	2,23	0,1593
Total error	2,88669E6	13	222053		
Total (corr.)	1,18002E7	22			

^aSuma de cuadrados, ^bGrados de libertad, ^cCuadrados medios

Empleando la ecuación 60 se obtuvieron las superficies de respuesta que permiten realizar predicciones del comportamiento de las variables dentro del intervalo estudiado. Así, al relacionar la temperatura con la relación de sustratos a una cantidad de enzima (%) constante, se observa que existen dos máximos en la variable de respuesta Y_1 (Figura 13).

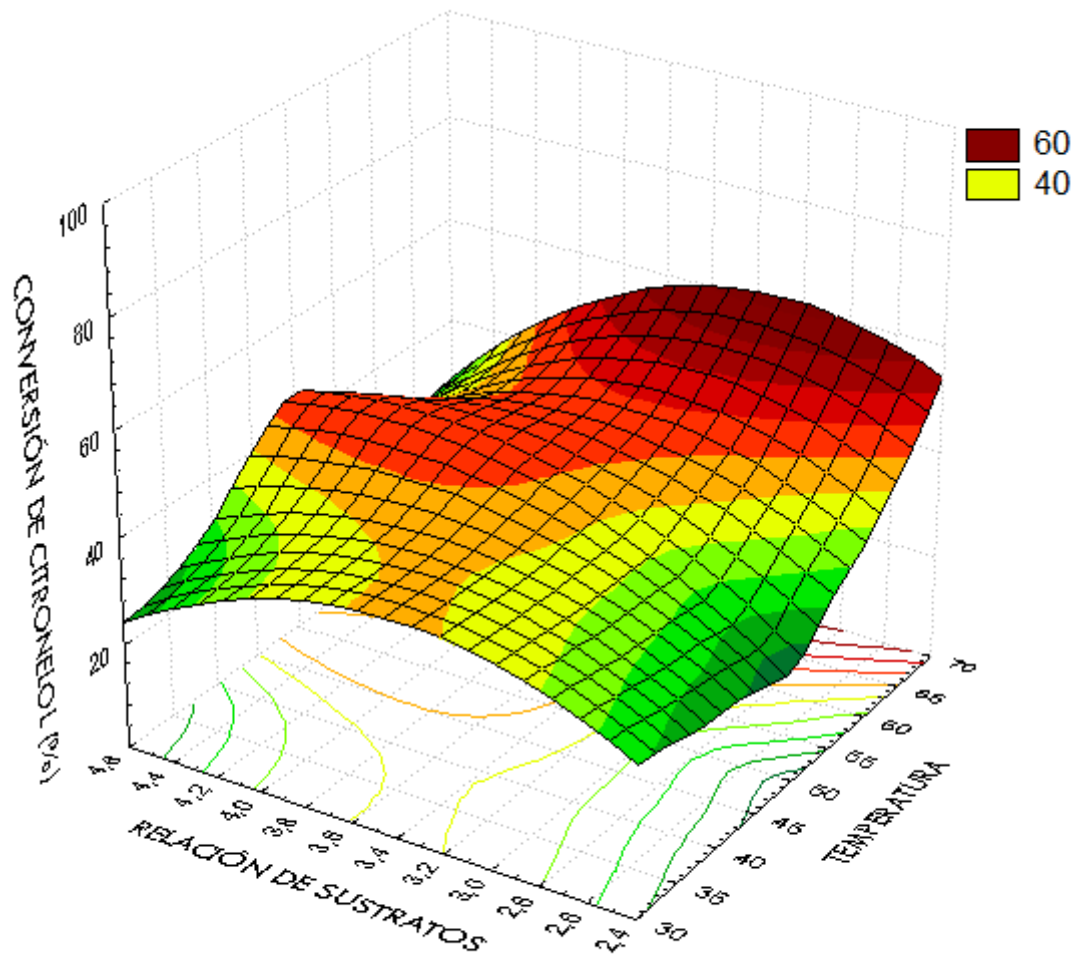


Figura 13. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de temperatura y relación de sustratos (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)

Una primera zona caracterizada por relaciones de sustrato altas y temperaturas entre 46 y 55 °C y una segunda zona comprendida entre relaciones de sustrato menores a 3,8 y temperaturas entre 65 y 75 °C, sin embargo, a temperaturas mayores a 70 °C la desnaturalización de la enzima es inminente. En

consecuencia, se deben emplear relaciones molares de sustrato mayores a 1:4 aceite/alcohol y temperaturas moderadas.

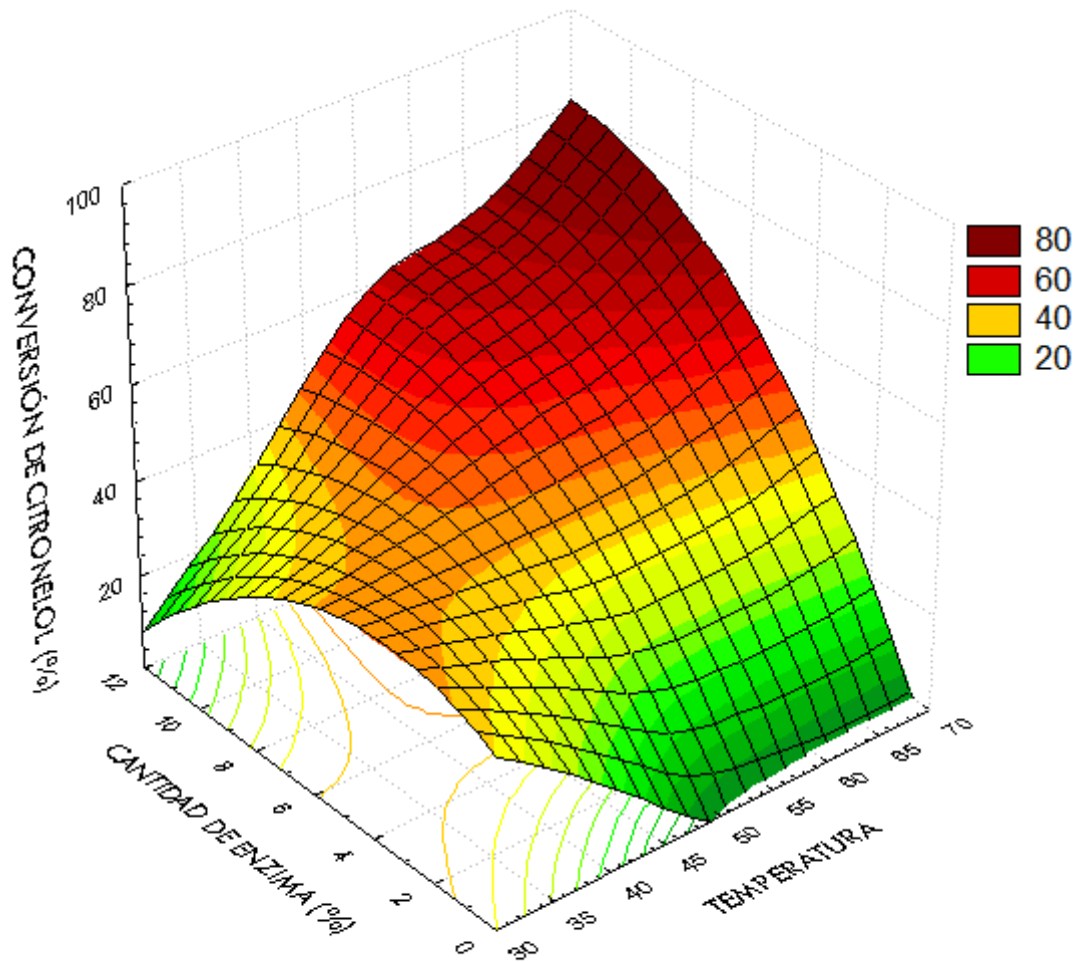


Figura 14. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de temperatura y cantidad de enzima (%) (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)

La interacción entre las dos variables más significativas estadísticamente, cantidad de enzima y relación de sustratos representada en la Figura 15, muestra la

existencia de una zona óptima de relaciones molares aceite\alcohol entre 1:2,8 – 1:4 para cantidades de enzima mayores del 6%.

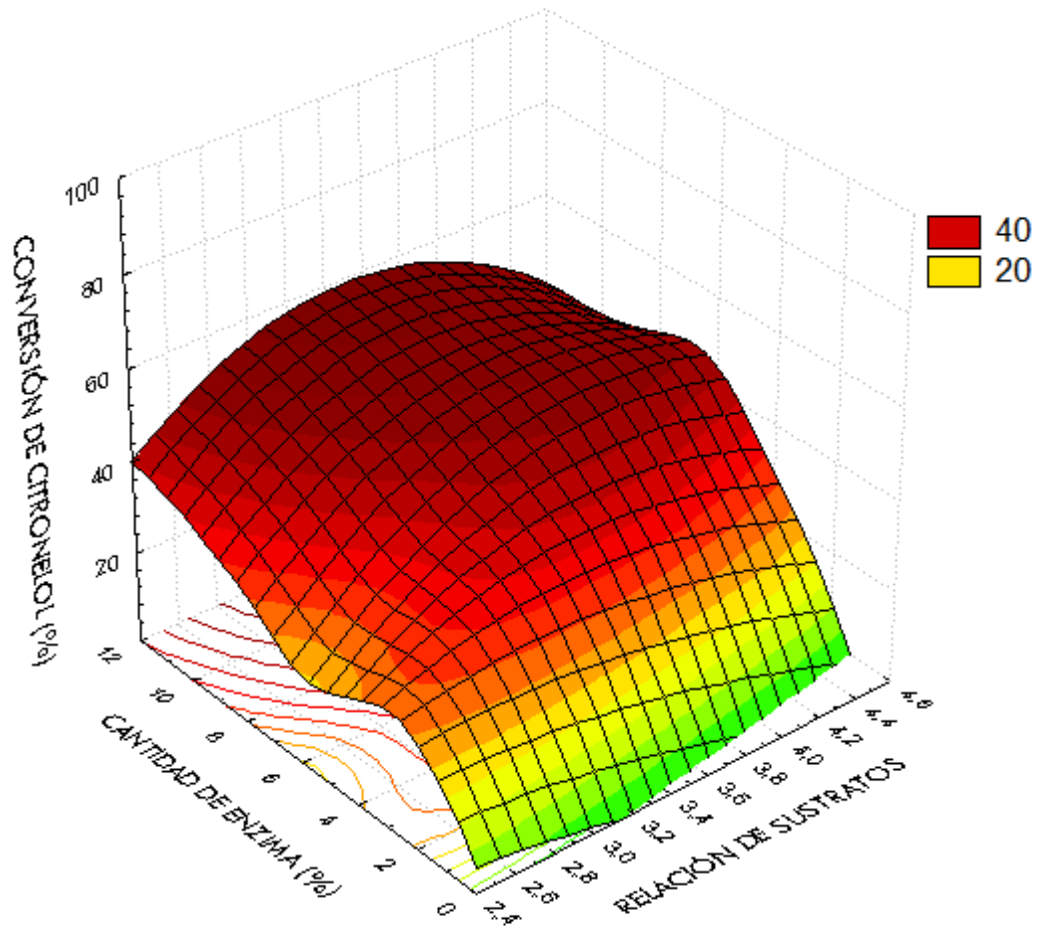


Figura 15. Superficie de respuesta del porcentaje de conversión del citronelol a diferentes niveles de relación de sustratos y cantidad de enzima (%) (Tiempo = 3 horas; Velocidad de agitación = 250 rpm)

Con base en estos resultados, se aplicó la *metodología de optimización multivariable*, con la cual se analiza de forma simultánea el efecto de las tres

variables analizadas sobre la variable de respuesta Y_1 , a fin de establecer las condiciones de reacción, en las cuales se maximiza la conversión del citronelol. En la Tabla 11, se relaciona el conjunto de condiciones obtenidas.

Tabla 11. Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad

Factor	Nivel Mínimo	Nivel Máximo	Nivel Óptimo
Temperatura	33,2 °C	66,83 °C	66,82 °C
Cantidad Enzima	0,95 %	11,04 %	11,04 %
Relación de sustrato	1:2,66	1:4,34	1:4,32
Conversión del citronelol teórico (%)			82,08
Conversión del citronelol experimental (%)			71,60

Es de resaltar que la relación molar de sustratos teórica aceite/citronelol 1:4.3, supera la relación estequiometrica (1:3), por lo cual se puede establecer que no hay inhibición de la enzima por el alcohol y que al contrario, un exceso de citronelol favorece su conversión.

En el caso de la concentración de enzima, el valor fijado en este trabajo (11% con respecto al peso del aceite) coincide con los establecidos en otras investigaciones en reacciones similares [Chatterjee y Bhattacharyya., 1999; Pilarek y col., 2007; Ognjanovic y col., 2009]. En cuanto a la temperatura hallada para Lipozyme TL IM fue superior (67 °C) a la reportada para Lipozyme RM IM (60 °C) y para lipasa aislada de *Candida rugosa* (35 °C).

En las condiciones de reacción seleccionadas se alcanzaron niveles de conversión del citronelol de 71.6% en tres horas. Otros autores han reportado conversiones del orden de 98% en 24 horas en la obtención del butirato de citronelol [Shied y

Lou; 2000] y del 90% en la obtención de malonato de citronelol, en este último caso usando un reactor de lecho empacado [Aziah, y col., 2009]. Lo anterior significa que la productividad de 2.2 g de ésteres/g de enzima*h alcanzada en este trabajo es el doble de la reportada por Chatterjee y Bhattacharyya., 1999, quienes usando aceite de coco y citronelol obtuvieron una productividad del 1 g de ésteres/g de enzima*h.

ETAPA III

En esta última etapa, la reacción se llevó a cabo en un reactor cerrado con capacidad de 25 mL y agitación orbital de 250 rpm a 67 °C, empleando 2 gramos de la mezcla de sustratos en una relación de aceite/ alcohol 1:4.3 y 11% de enzima con respecto al peso del aceite inicial y un tiempo de reacción de tres horas.

Se evaluaron tres sistemas: aceite de palmiste/citronelol que corresponde al evaluado en el presente trabajo y que corresponde a un sistema complejo por la presencia de varios ácidos grasos de diferente longitud de la cadena y diferente nivel de insaturación y los sistemas aceite de palmiste hidrogenado/citronelol y aceite de palma hidrogenado/citronelol como sistemas modelos menos complejos porque contienen menos ácidos grasos en su composición y no hay ácidos grasos insaturados. En el caso del sistema aceite de palma hidrogenado, prácticamente se tienen dos sustratos.

3.4 Evaluación de los modelos cinéticos para la reacción de alcoholisis

Debido a que la reacción se realizó en ausencia de solvente, la concentración del citronelol y la de los triacilglicéridos de los aceites seleccionados son interdependientes; por lo tanto, la concentración de triacilglicéridos dentro del modelo cinético puede ser expresado como una función de la concentración del

alcohol y la densidad de la mezcla reaccionante como se señala en la ecuación 61 [Xu y col., 2005] :

$$\frac{(\rho_{mezcla} - M_A [A])}{M_{TG}} \quad (61)$$

donde, ρ_{mezcla} es la densidad de la mezcla de reacción, M_A y M_{TG} son los pesos moleculares del citronelol y de los triacilglicéridos de los aceites evaluados respectivamente y $[A]$ es la concentración del citronelol en la mezcla. En el anexo 3, se relacionan los valores de las densidades de las mezclas usadas para la evaluación de los modelos. Como se observa en la Figura 16 los valores de las densidades del sistema de mezcla aceite de palmiste/citronelol varía en un rango de 0,84 – 0.94 g/ml; mientras que para los dos sistemas compuestos por aceites hidrogenados el rango oscila entre 0,89 – 0.95 g/ml; en todos los sistemas disminuye la densidad al aumentar las relaciones molares aceite/alcohol.

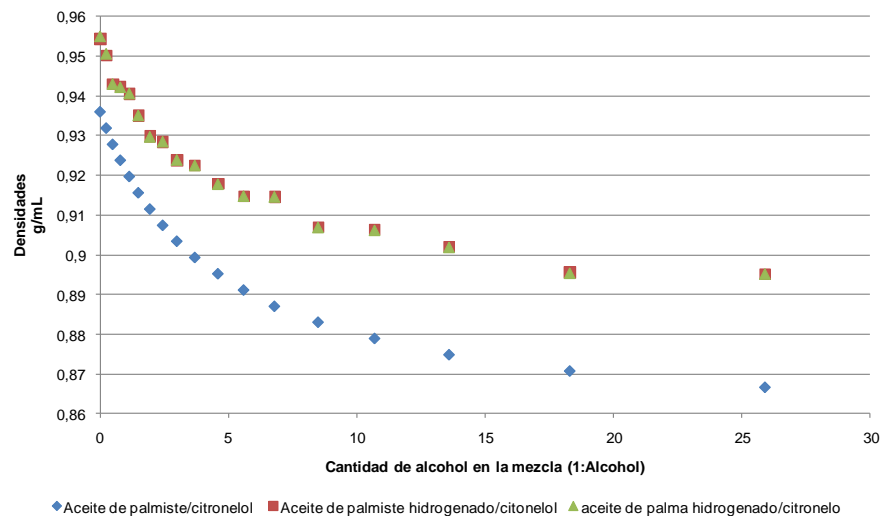


Figura 16. Densidades experimentales versus relación molar de sustratos

3.4.1 Determinación de los parámetros del modelo

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción se usaron relaciones molares de sustratos que oscilan entre 1:25,9 y 1:0,0125 aceite/alcohol.

Tabla 12. Velocidades de reacción calculadas desde los datos experimentales

Molaridad Citronelol PKO/Citronelol	Molaridad Citronelol PKOH/Citronelol POH/Citronelol	Velocidad inicial de reacción (mol/L)/min		
		PKO/Citronelol	PKOH/Citronelol	POH/Citronelol
4,75	4,62	1,125	0,183	0.192
4,50	4,33	1,101	0,301	0.205
4,23	4,03	1,032	0,421	0.243
3,98	3,76	1,000	0,509	0.247
3,72	3,47	0,949	0,622	0.295
3,44	3,18	0,873	0,812	0.305
3,18	2,92	0,795	0,949	0.357
2,92	2,65	0,748	1,167	0.407
2,62	2,35	0,690	1,310	0.425
2,33	2,07	0,592	1,420	0.417
2,06	1,82	0,519	1,439	0.419
1,78	1,55	0,441	1,340	0.397
1,48	1,28	0,358	1,336	0.376
1,21	1,03	0,343	1,228	0.300
0,90	0,76	0,224	1,111	0.237
0,60	0,50	0,183	0,956	0.184
0,32	0,26	0,103	0,669	0.128
0,02	0,01	0,006	0,096	0,005

En cada caso las velocidades iniciales de reacción se calcularon a partir de los datos obtenidos experimentalmente. Como se observa en la Tabla 12 las velocidades iniciales de reacción para los sistemas evaluados difieren en rangos bien definidos, es así como, el sistema compuesto por el aceite de palmiste - citronelol tiene velocidades iniciales en un rango de 1,125 a 0,005 mol/l min a diferencia del los sistema aceite de palmiste hidrogenado – citronelol y el sistema aceite de palma hidrogenado – citronelol que se encuentra en un rango de velocidades iniciales de 0,193 – 0,005 mol/l min. Esta diferencia, puede atribuirse a la composición en ácidos grasos que cada uno de los sistemas posee, los dos aceites hidrogenados tienen como componentes principales el ácido láurico y el ácido esteárico en proporción 47,70 % y 49,30 % respectivamente; mientras el aceite de palmiste tiene mayor diversidad de ácidos grasos (Tabla 4) lo que hace de la mezcla un sistema más complejo debido a que da lugar a una mayor cantidad de ésteres de citronelol

Con las velocidades iniciales y los valores de concentración de sustratos se procedió a resolver los modelos cinéticos propuestos (ecuaciones 55 - 58) para cada sistema de reacción y se encontró que los sistemas de reacción aceite de palma hidrogenado – citronelol y aceite de palmiste hidrogenado - citronelol, se ajustan a un mecanismo ordenado bi bi con inhibición por alcohol y el sistema de estudio aceite de palmiste citronelol se ajusta a un modelo pin pong bi bi.

En la tabla 13, se relacionan los parámetros de los modelos cinéticos estimados a partir de las velocidades iniciales de reacción usando el software Polymath Professional versión 6.1. Los valores encontrados para las constantes K_{mA} de los sistemas compuestos por los aceites hidrogenados son menores al obtenido para el sistema aceite de palmiste/citronelol, indicando un efecto inhibitorio por parte del alcohol para los sistemas menos complejos debido a que estos sistemas son catalíticamente más eficientes a bajas concentraciones de citronelol. Esta

inhibición podría ser disminuida utilizando una menor concentración de triacilglicéridos en la mezcla de reacción.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de los modelos evaluados

Sistemas de reacción	Mecanismo de reacción	Parámetros cinéticos				
		V_{max}^a (M min ⁻¹)	K_{mTG}^b (mol/l)	K_{mA}^c (mol/l)	K_i^d (mol/l)	R^2
Aceite de palmiste Citronelol	Mecanismo Ping Pong Bi Bi	2,9008	0,0034	8,1281	-	0.998
Aceite de Palmiste Hidrogenado Citronelol	Modelo Ordenado Bi Bi con inhibición por alcohol	8,7004	1,1179	2,1498	2,0713	0,985
Aceite de Palma Hidrogenado Citronelol	Modelo Ordenado Bi Bi con inhibición por alcohol	1.485	2.357E-10	3.369	7.237E-10	0.968

- a. Velocidad máxima. b. Constante aparente de Michaelis para los triacilglicéridos.
c. Constante aparente de Michaelis para el citronelol. d. Constante de aparente inhibición para el citronelol

A partir de los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 13 se puede deducir que el sistema aceite de palmiste hidrogenado/citronelol presenta la más baja afinidad de la enzima por los triacilglicéridos con un valor en la constante aparente de Michaelis, K_{mTG} de 1,12 mol/l a diferencia del sistema aceite de palma hidrogenado/citronelol que presenta una mayor afinidad por los triacilglicéridos debido a su valor de 2.357E-10 mol/l para la constante aparente de Michaelis, K_{mTG} . De los tres sistemas evaluados, el sistema aceite de palmiste/citronelol obtuvo un valor de 8,13 mol/l en la constante de Michaelis – Menten para el alcohol indicando la baja afinidad de la enzima por el citronelol y por lo tanto menor inhibición por parte de este sustrato.

En las Figuras 15, 16 y 17 se representan las curvas de saturación de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* Lipozyme TL IM para los sistemas evaluados. En ellas se observa cómo evoluciona la velocidad inicial de la reacción con la concentración de sustrato, encontrándose que para los sistemas compuestos por aceites hidrogenados se presenta inhibición por sustrato (Figura 15 y 16), en este caso por el citronelol, a partir de la relación molar aceite/alcohol (1:2).

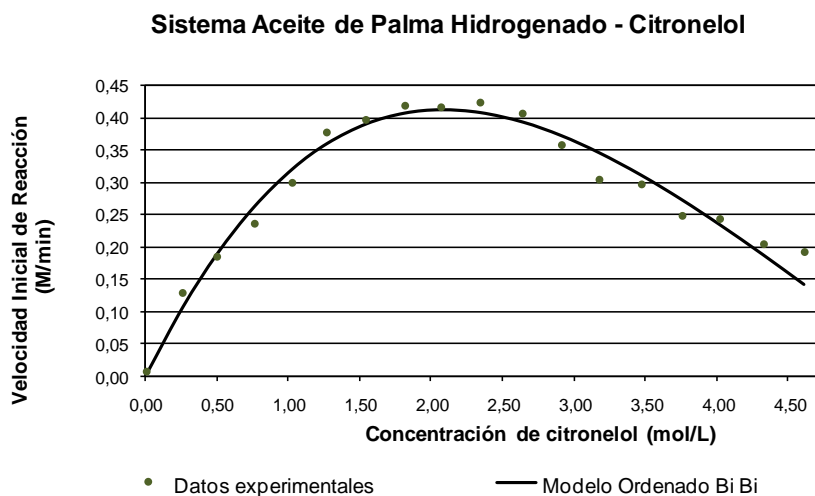


Figura 17. Comparación de los modelo predictivos y los datos experimentales de velocidad inicial de reacción. (Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palma hidrogenado – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm)

Para el sistema aceite de palmiste - citronelol se observa que a medida que aumenta la concentración de citronelol en la mezcla reaccionante la velocidad inicial de reacción aumenta gradualmente, y no se observa inhibición por sustrato (Figura 17).

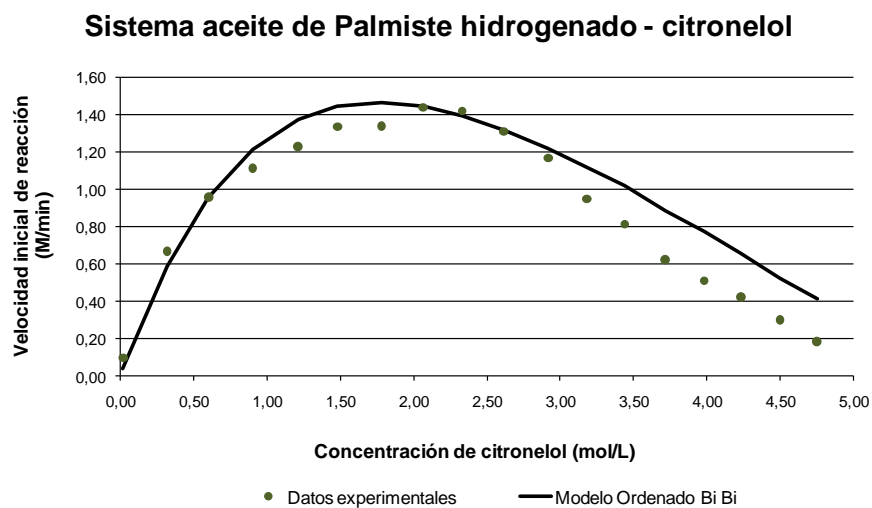


Figura 18. Comparación de los modelo predictivos y los datos experimentales de velocidad inicial de reacción. (Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palmiste – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm)

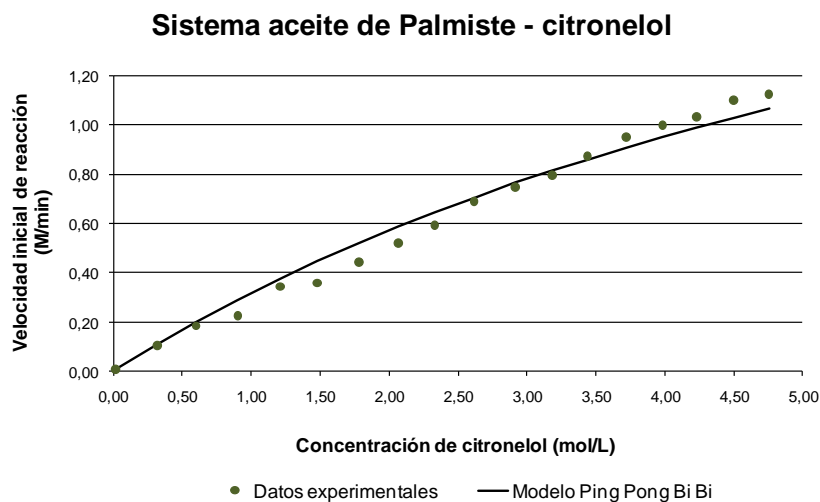


Figura 19. Comparación del modelo predictivo y los datos experimentales de velocidad inicial de reacción. Condiciones de reacción: 2 gramos de mezcla aceite de palma – citronelol, 11 % enzima Lipozyme TL IM, 67 ° C, 250 rpm

No hay en la bibliografía reportes sobre los valores de K_{mTG} y K_{mA} para la reacción de alcoholólisis usando aceite de palmiste como sustrato; sin embargo Xu y col., 2005 simularon un modelo cinético Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por sustrato usando aceite de soya refinado y metilacetato y reportaron valores para estas constantes de 1 mol/l y 16 mol/l, respectivamente usando lipasa de *Candida antártica* (Novozyme 435). Los valores obtenidos en este estudio para el sistema aceite de palmiste-citronelol son similares.

Para los sistemas que tienen aceites hidrogenados se obtienen parámetros cinéticos similares a los reportados por Yadav y Lathi., 2004 y Serri y col; 2006 quienes evaluaron el sistema ácido láurico – citronelol encontrando que la reacción se ajusta a un mecanismo Ordenado bi bi sin disociación del complejo enzima - ácido láurico, usando las enzimas inmovilizadas de *Candida antártica* y *Candida rugosa*, respectivamente. En estos casos sin embargo las reacciones fueron llevadas a cabo en sistemas con solvente.

En este trabajo se encontró que los sistemas aceite de palmiste hidrogenado – citronelol y aceite de palma hidrogenado – citronelol se ajustan de manera adecuada al mecanismo Ordenado Bi Bi con inhibición por alcohol. Asimismo, Pilarek y col. 2007, quienes usaron un sistema compuesto por triacilglicéridos puros (triacetina y tricaprilina) e isopropanol y emplearon Lipozyme TL IM, encontraron inhibición por el alcohol debido a que la enzima era inactivada por efecto del mismo. De igual forma, Al-Zuhair S., 2007 en la producción de biodiesel por metanolólisis enzimática de aceites vegetales con lipozyme TL IM, determinó que a altas concentraciones de triglicéridos puros se presenta inhibición competitiva debido a que la enzima se une al alcohol presente en la reacción. Este fenómeno de inactivación enzimática también fue atribuido a los efectos causados por la polaridad de la mezcla de reacción y algunos autores han reportado que en sistemas no acuosos la polaridad es el principal factor que

determina la actividad enzimática, incluso así los cambios en la polaridad sean pequeños [Bhandarkar y Neau., 2000].

3.5 Diseño básico del reactor enzimático sobre condiciones ideales

El diseño básico y la evaluación de desempeño de un reactor enzimático se refieren a las condiciones ideales de operación del reactor. En este punto usando los resultados obtenidos en el apartado anterior se procedió a realizar los balances de materia para reactores por lotes, lecho empacado y tanque agitado para obtener las funciones de velocidad en función de la conversión.

En la figura 20 se representa el comportamiento de un reactor por lotes para un sistema aceite de palmiste – citronelol que sigue un mecanismo cinético Ping Pong Bi Bi. Se observa que al limitar la concentración de citronelol se requiere menor cantidad de catalizador, mientras que al limitar la concentración de triglicérido se requiere mayores cargas de catalizador.

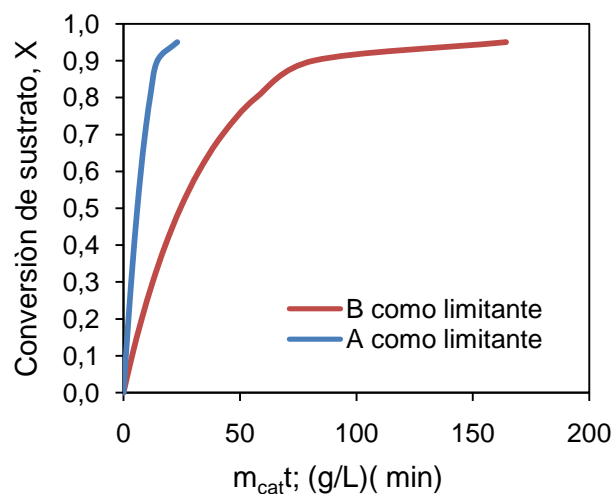


Figura 20. Desempeño de un reactor por lotes para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol) como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM)

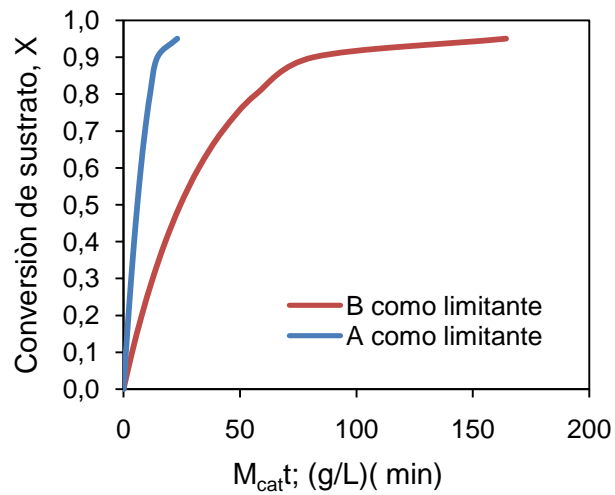


Figura 21. Desempeño de un reactor de lecho empacado para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol), como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM)

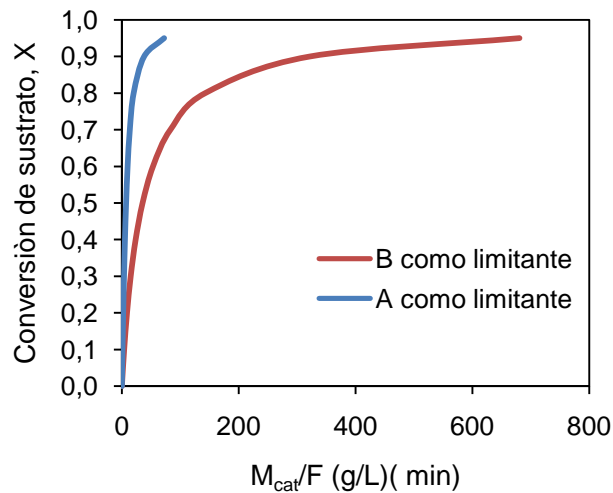


Figura 22. Desempeño de un reactor de tanque agitado para la cinética Ping Pong Bi Bi ($a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM) con A (citronelol), como sustrato limitante ($a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM) o con B (Triacilgliceridos) como sustrato limitante ($a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM)

Para un reactor de lecho empacado se da un comportamiento similar al observado para el reactor por lotes como se ve en la Figura 21. En un reactor de tanque agitado aún cuando se observa la misma tendencia (Figura 22), se requieren mayores cargas de catalizador para alcanzar las conversiones obtenidas en un reactor por lotes y/o de lecho empacado.

Con base en lo anterior, se puede establecer finalmente que los reactores de lecho empacado tienen un mejor comportamiento para llevar a cabo la reacción de alcoholólisis como puede verse al comparar los sistemas evaluados (ver Figura 23).

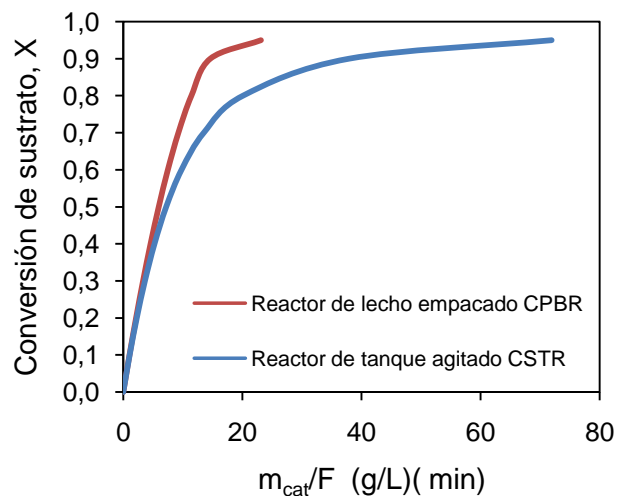


Figura 23. Desempeño de los reactores CPBR y CSTR para una cinética Ping Pong Bi Bi (A como sustrato limitante). $a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM; $a_i = 10$ mM; $b_i = 43$ mM

Finalmente, la reacción de alcoholólisis entre el aceite de palmiste y el citronelol catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* Lipozyme TL IM en sistema libre de solvente puede ser descrita por medio del Mecanismo Ping Pong Bi Bi. Es importante destacar que el mecanismo Ping Pong Bi Bi se ha reportado por otros autores que han concluido que este mecanismo se ajusta con mayor precisión a sistemas de reacción compuestos por sustratos complejos como los aceites

vegetales usando en estos casos alcoholes alifáticos de bajo peso molecular [Bhandarkar y col., 2000; Paiva y col., 2002; Xu y col., 2005; Pilarek y col., 2007; Al-Zuhair., 2007].

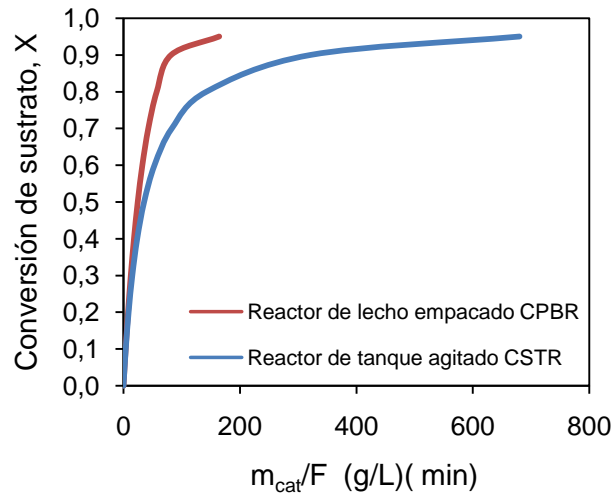


Figura 24. Desempeño de los reactores CPBR y CSTR para una cinética Ping Pong Bi Bi (B como sustrato limitante). $a_s = 250$ IU/g; $K_{mTG} = 8128,1$ mM; $K_{mA} = 3,4$ mM; $a_i = 43$ mM; $b_i = 10$ mM

En cuanto al reactor que ofrece ventajas para llevar a cabo el escalado del proceso a nivel de laboratorio, los mejores resultados se alcanzan con un reactor de lecho empacado.

4 CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la producción de ésteres de citronelol a través de la reacción de alcoholísis 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 conversión del 71,9% a 67°C, 3h de reacción, relación molar de sustratos aceite/ alcohol 1:4.3 y cantidad enzima con respecto al peso del aceite inicial del 11%.
- ✓ El sistema de reacción evaluado no presentó restricciones difusionales internas, pero si presentó restricciones difusionales externas que pueden ser reducidas al utilizar velocidades de agitación mayores a 200 rpm en el sistema de reacción.
- ✓ Se encontró que la cantidad de enzima y la relación molar de sustratos son las variables más significativas para la reacción de alcoholísis catalizada por la lipasa Lipozyme TL IM en la obtención de ésteres de citronelol. En el caso de la temperatura existe una correlación positiva y directa entre esta variable y la conversión del citronelol.
- ✓ El modelo cinético que sigue un mecanismo Ping Pong Bi Bi describe la síntesis enzimática de los ésteres de citronelol con un ajuste significativo de los datos experimentales (R^2 0.998).
- ✓ El mejor sistema para escalar el proceso a nivel de laboratorio es el reactor de lecho empacado.

BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS, Houria and COMEAU Louis. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 32 (2003); p. 589-595
2. ABDULLAH A.Z., SULAIMAN N.S., KAMARUDDIN A.H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 44, N° 2 - 3 (2009); p. 263-270
3. 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
4. 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
5. AKOH, C.C.; LEE, K.T.; FOMUSO L.B., *et al.* Structural modified food fats: Synthesis, biochemistry and use 46 AOCS Press, IL, 1998, citado por: Iwasaki y Yamane, 2000.
6. AKOH, C. C. and YEE, L. N. Lipase-catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media. En: Journal of Molecular Catálisis B: Enzymatic. Vol. 4 (1998); p. 149-153

7. ALVES, M. G; SOBERÓN, L. M. M. and PASTORE, G. M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by new lipase from *Rhizopus sp.* En: Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 6, No. 1 (2003); p. 72 - 74
8. AL-ZUHAIR S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. En: Biotechnology progress. Vol. 21, N°5, (2005); p. 1442-1448
9. AL-ZUHAIR, S. *et al.* Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. En: Process Biochemistry, Vol. 42, N° 6 (2007); p. 951-960
10. AMISH P.*et al.* Review on FAME production processes. En: Fuel. Vol. 89, No. 1, (2010); p. 1-9
11. ARMANDO, J.D and SILVESTRE, A.G. Terpenes: Major sources, properties and applications. En: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. (2008); p. 17-38
12. AZIAH S.N., KAMARUDDIN A.H., TAU L.K.Y. A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: Investigation of parameter and kinetics study. En: Food and Bioproducts Processing. (2009)
13. 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)

14. BHANDARKAR, S.V. *et al.* Lipase-catalyzed enantioselective esterification of flurbiprofen with n-butanol. En: Journal of Biotechnology. Vol. 3 (2000); p. 195 – 201
15. BAKKALI F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. En: Food and Chemical Toxicology Vol. 46 (2008); p. 446–475
16. BETTS, T.J. Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. En: Journal of Chromatographic A. Vol. 936 (2001); p. 33–46.
17. BEZBRADICA, D. *et al.* The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 38 (2006); p. 11-16
18. BEZBRADICA, D. *et al.* The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free system. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 45 (2007); p. 97-101
19. CASTRO, H.F; OLIVEIRA P.C. and PEREIRA, E.B. Evaluation of different approaches for lipase catalysed síntesis of citronellyl acetate. En: Biotechnology Letters. Vol. 19 (1997); p. 229-232
20. CHATTERJEE, T. and BHATTACHARYYA, D.K. Synthesis of geranyl and citronellyl esters of coconut oil fatty acids through alcoholysis by *Rhizomucor miehei* lipase catalysis. En: JAOCS. Vol. 76, No. 12 (1999); p. 1501- 1504

21. CHOWDARY, G. V. and PRAPULLA S. G. Enzymatic synthesis of ethyl hexanoate by transesterification. En: International Journal of Food Science and Technology. Vol. 38 (2003); p. 127-133
22. CHULALAKSANANUKUL, W; CONDORET, J. S. and COMBES, D. Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in n-hexane. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 14 (1992); p. 293-298
23. CHULALAKSANANUKUL, W. *et al.* Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n – hexane. En: FEBS 09208. Vol. 276 N° 1,2 (1990); p. 181 – 184.
24. CLAON, A. P. and AKOH, C. C. Effect of reaction parameters on SP435 lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 16 (1994); p. 835-838
25. CLAON, A. P. and AKOH, C. C. Lipase-catalyzed synthesis of terpene esters by transesterification in n-hexane. En: Biotechnology Letters. Vol. 16, No. 3 (1994); p. 235-240
26. CLELAND W.W. The kinetic of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. Nomenclature and rate equations. En: Biochim. Biophys. Acta. Vol. 67 (1963); p. 104 -137.
27. CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., and LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). En: Buchanan, B., Grisseem, W., Jones, R. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. (2000).

28. D'AGOSTINI, D.; CIMA F. R.; GIOIELLI L.A. ; *et al.* Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación de las mezclas binarias y ternarias de las grasas de palma, semilla de palma y triglicéridos de cadena media. En: *Grasas y Aceites*. Vol. 52 N° 3-4 (2001); p. 214-221
29. DEMMYTTENAERE, J.C.R.; VANOVERSCHELDE, and J.; KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.*, and the use of solid-phase microextraction for screening. En: *Journal of Chromatography A*. Vol. 1027 (2004); p. 137-146
30. DOSSAT V., COMBES D. and MARTY A. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 30 (2002); p. 90-94.
31. DU *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 30, (2004); p. 125–129
32. FEDEPALMA. Anuario estadístico. Estadísticas de la palma de aceite en Colombia. (2008); p. 60 – 66
33. FORJAN P. *et al.* What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. En: *Biochimie*. (2000); p. 1033 - 1041
34. GARCIA, T. *et al.* Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. kinetic approach. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 25 (1999); p. 584-590
35. GHANEM A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds En: *Tetrahedron*. Vol.63 (2007); p. 1721-1754

36. GUBICZA, L. *et al.* Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. *En: Journal of Biotechnology*. Vol. 84 (2000); p. 193-196
37. HASAN, B. and BAYDAR N.G. The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.) *En: Industrial Crops and Products*. Vol. 21 (2005); p. 251–255
38. HUSUM, T.L.; PEDERSEN, L.S.; NIELSEN, P.M.; *et al.* Enzymatic interesterification: Process advantages and product benefits. *En: Palm Oil Developments*. Vol. 39 (2005); p. 1-10.
39. ILLANES, A and ALTAMIRANO C. *Enzyme Biocatalysis*. Chile: Springer, 2008, p. 205- 254.
40. 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
41. IWAI M., TSUJISAKA Y., FUKUMOTO J. Studies on lipase: purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *En: J. Gen. Appl. Microbiology*. Vol. 9 (1963); p. 353- 361.
42. JAIN, N. *et al.* Essential oil composition of geranium (*Pelargonium sp.*) from the plains of Northern India. *En: Flavour and Fragrance*. Vol. 16 (2001); p. 44-46
43. JIROVETZ, L., *et al.* Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of

- Rosa damascena* from China. En: Flavour Fragrance Journal. Vol. 20 (2005); p. 7–12.
44. JOICHI, A., *et al.* Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses. En: Flavour Fragrance Journal. Vol. 15 (2005); p. 152–157
45. KIRAN, K.R., *et al.* An esterification method for determination of lipase activity. En: Biotechnology Letters. Vol. 22 N° 19 (2000); p. 1511-1514
46. KIRAN, G. D. BABU and KAUL, V. K. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium sp.*) distilled by different distillation techniques. En: Flavour and Fragrance. Vol. 20 (2005); p. 222–231
47. 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
48. KRAAI, G.N. *et al.* Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1 – butanol in a biphasic system. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 41 (2008); p. 87 – 94
49. LAGRAN, G.; TRIANTAPHYLIDES, C. and BARATTI, J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. En: Biotechnology Letters. Vol. 10, No. 8 (1988); p. 549-554
50. LAGRAN, G. *et al.* Short Chain flavour esters synthesis by microbial lipases. En: Biotechnology Letters. Vol. 12, No. 8 (1990); p. 581-586

51. LESKOVAC VLADIMIR. Comprehensive enzyme kinetics. Kluwer Academic Publishers. New York (2003) p. 100 – 120.
52. MACRAE A. Enzymatic interesterification, LPS117. En: *Society of Chemical Industry*, SCI lectures paper series. 2000:. ISSN 1353-114
53. MARLOT, C. *et al.* Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports. En: *Biotechnology Letters*. Vol. 7, No. 9 (1985); p. 647-650
54. 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
55. MITTELBACH, M. Lipase Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 67 (1990); p. 168–170.
56. MORENO, S.N. Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga (2001); p. 109
57. MÜLLER, P.M, and LAMPARSKY, D. *Perfumes: Art, Science & Technology*. Amsterdam, New York: Elsevier; 1991
58. NAKAGAWA, H. *et al.* Enzymatic synthesis of terpenyl esters by transesterification with fatty acid vinyl esters as acyl donors by *Trichosporon fermentans* lipase. En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 14 (1998); p. 219-222

59. NOUREDDINI H., GAO X. and PHILKANA R.S.. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. En: *Bioresource Technology*. Vol. 96, N° 7 (2005); p. 769-777
60. OGNJANOVIC, N. *et al.* Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. En: *Bioresource Technology* Vol. 100 N° 21 (2009); p. 5146-5154
61. OHLOFF, G. Scent and fragrances. The fascination of Odors and their Chemical Perspectives. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1994
62. ÖZEL, M.Z; GOGÜS, F. and LEWIS, A.C. Comparison of direct thermal desorption with water distillation and superheated water extraction for the analysis of volatile components of *Rosa damascena* Mill. using GCxGC-TOF/MS En: *Analytica Chimica Acta*. Vol. 566 (2006); p. 172–177
63. PAIVA, A.L; ROSSUM, D.V. and MALCATA, F.X. Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane. En: *Biocatalysis and Biotransformation*. Vol. 20 (2008); p. 43-51
64. PETERSON, A. *et al.* Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. En: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 81 (2006); p. 167–172
65. PEREGO C. and PERATELLO S. Experimental methods in catalytic kinetics. En: *Catalysis Today*. Vol. 52 (1999); p. 133-145
66. PILAREK, M. *et al.* Kinetic model of 1,3 – specific triacylglycerols alcoholysis catalized by lipase. En: *Journal of Biotechnology*. Vol. 127 (2007); p. 736 -744

67. RAJESWARA, B.R. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. En: Flavour and Fragrance Journal. Vol. 18 (2003); p. 133–135
68. SALAH, R. B. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. En: Journal Of Bioscience And Bioengineering. Vol. 103, No. 4, (2007); p. 368–372.
69. SELL, C.S. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Cambridge: Royal Society Chemistry. 2003.
70. SELMI, B. and THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium En: Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol. 75, N° 6, (1998); p. 691-695
71. 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
72. SERRI, A. and KAMARUDDIN A.H. Studies of reaction parameters on synthesis of citronellyl laurate ester via immobilized *Candida rugosa* lipase in organic media. En: Bioprocess Biosyst Eng. Vol. 29, (2006); p. 253-260
73. SERRI N. A., KAMARUDDIN A.H and TAU LEN K.Y. A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: Investigation of parameter and kinetics study. En: Food and Bioproducts Processing. (2009)

74. SHIEH C-J and LOU Y-H. Five - factor response surface optimization of the enzymatic synthesis of citronellyl butyrate by lipase IM77 from *Mucor miehei*. Vol. 77, N° 5, (2001); p. 521 – 525
75. SHINTRE, M. S., GHADGE R. S and. SAWANT. S. B. Kinetics of esterification of lauric acid with fatty alcohols by lipase: effect of fatty alcohol. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Vol. 77 (2002); p. 1114-1121
76. STAMATIS, H. *et al.* Studies on the synthesis of short-chain geranyl ester catalysed by *Fusarium oxysporum* esterase in organic solvents. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 4 (1998); p. 229-236
77. STEPHEN G.P. Lipids, Terpenes, and Related Substances. En: Physiology of Woody Plants (Third Edition) (2008); p. 217-232
78. SWIFT A.D. Karl. Catalytic transformations of the major terpene feedstocks. En: Topics in Catalysis. Vol. 12 N° 2 (2004), p. 131 – 141
79. TORRES, F. C. *et al.* Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 34 (2007) p. 165-171
80. YADAV, G. D. and LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 27 (2004); p. 113-119

81. 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
82. YEE, L. N; AKOH, C. C. and PHILIPS, R. S. Terpene ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification. En: Biotechnology Letters. Vol. 17, No. 1 (1995); p. 67-70
83. WALSH, C. Enzymatic reaction mechanisms, W. H. Freeman, New York. (1998) p. 160 - 161
84. WANG, Y. and LINKO Y-Y. Lipase-catalyzed enantiomeric synthesis of citronellyl butyrate. En: Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 80, No. 5 (1995); p. 473-477
85. XU Y., DU W. and LIU D. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 32, N° 5-6 (2005); p. 241-245

ANEXOS

ANEXO 1

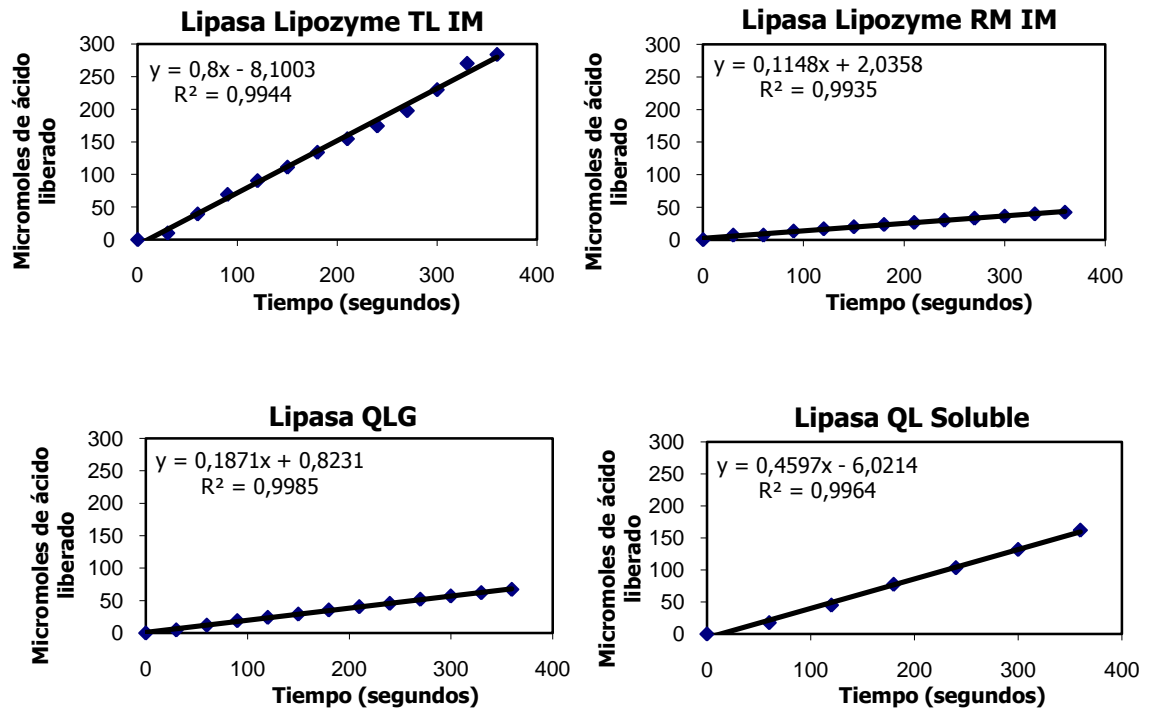


Figura 25. Gráficas para determinar la actividad hidrolítica de las enzimas

ANEXO 2

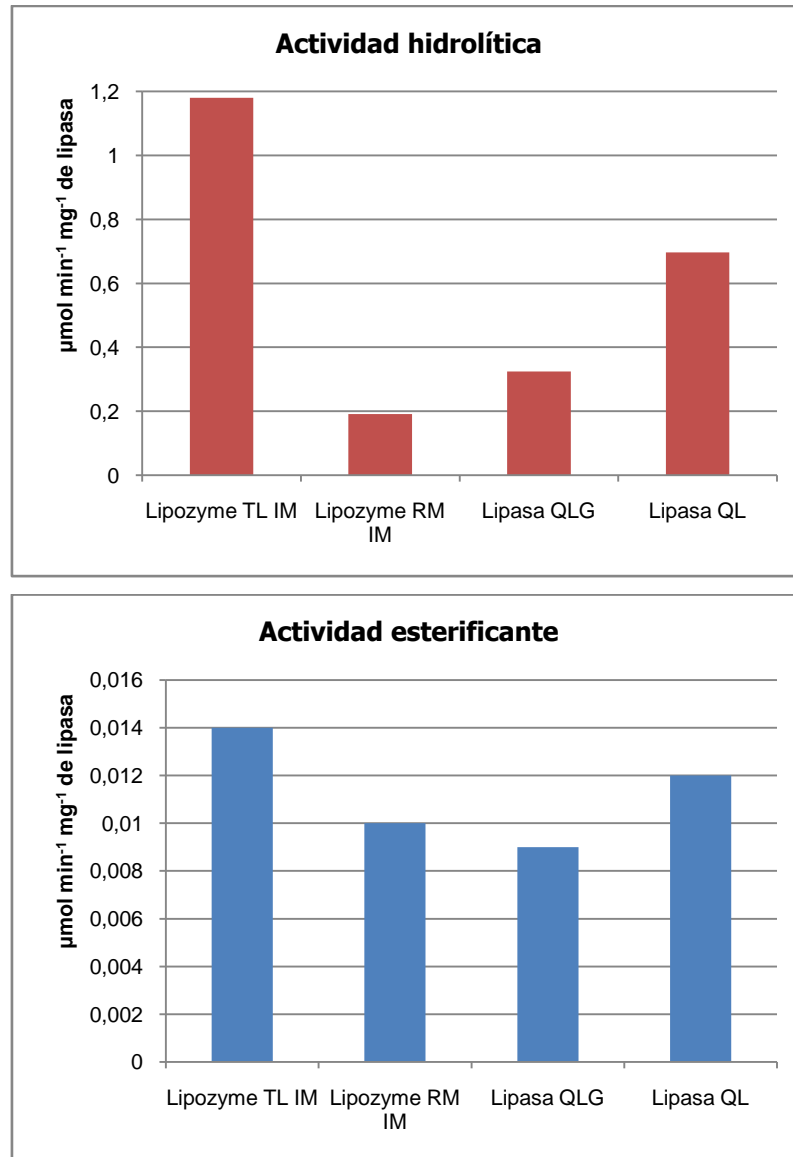


Figura 26. Gráficas comparativas entre la actividad hidrolítica y la actividad esterificante de las lipasas evaluadas

ANEXO 3

Tabla 14. Densidades experimentales

Numero de exp.	Relaciones [Aceite (1): Alcohol (X)]	Densidad (g/mL) PKO/Citronelol	Densidad (g/mL) PKOH/Citronelol	Densidad (g/mL) POH/Citronelol
1	1: 25,9	0,8666	0,8951	0,8951
2	1: 18,3	0,8707	0,8955	0,8953
3	1: 13,6	0,8748	0,902	0,9018
4	1: 10,7	0,8789	0,9063	0,9061
5	1: 8,5	0,8830	0,907	0,9068
6	1: 6,8	0,8870	0,9145	0,9145
7	1: 5,6	0,8911	0,9147	0,9147
8	1: 4,6	0,8952	0,9178	0,9177
9	1: 3,7	0,8993	0,9224	0,9224
10	1: 3	0,9034	0,9238	0,9238
11	1: 2,45	0,9074	0,9284	0,9284
12	1: 1,95	0,9115	0,9298	0,9296
13	1: 1,5	0,9156	0,935	0,935
14	1: 1,15	0,9197	0,9405	0,9405
15	1: 0,8	0,9238	0,9424	0,9421
16	1: 0,5	0,9278	0,9429	0,9429
17	1: 0,25	0,9319	0,9502	0,9505
18	1: 0,0125	0,936	0,9543	0,9549

PKO: Aceite de palmiste. PKOH: Aceite de palmiste hidrogenado POH: Aceite de palma hidrogenado

ANEXO 4

REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN					
SUSTRATOS	ENZIMA	SISTEMA DE REACCIÓN	MECANISMO	CONSTANTES CINÉTICAS	REFERENCIA
Ácido oleico 1- Butanol	<i>Rhizomucor miehei libre</i>	Sistema bifásico Hexano	Ping Pong Bi Bi con inhibición por 1-butanol	K_{enz} ($\times 10^{-3}$ mol _{aq} /g _{enz} L _{org} S) 7,384 \pm 0.001 $K_{M,FA}$ ($\times 10^{-2}$ mol/L _{org}) 6,776 \pm 0.026 $K_{M,BuOH}$ ($\times 10^{-1}$ mol/L _{org}) 2,536 \pm 0.011 $K_{I,BuOH}$ ($\times 10^{-1}$ mol/L _{org}) 1,277 \pm 0.004 R^2 0,930	KRAAI, G.N. <i>et al.</i> (48)
Ácido láurico Citronelol	<i>Candida rugosa</i> Inmovilizada	n-hexano n-heptano Iso-octano	Ordenado Bi Bi con complejo dead end por ácido láurico	$V_{m\acute{a}x}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L min g _{enz}) 0,0698 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) 0,3486 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) 0,7471 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) 0,0078 R^2 0,9927	SERRI, A. and KAMARUDDIN A. H. (72)
Ácido láurico Citronelol	<i>Candida rugosa</i> Inmovilizada	n-hexano n-heptano Iso-octano	Ping Pong Bi Bi con complejo dead end de ácido láurico	$V_{m\acute{a}x}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L min g _{enz}) 0,5509 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) -50.4998 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) 1,0172 $K_{M,\acute{a}cid}$ ($\times 10^{-3}$ mol/L g _{enz}) 0,0834 R^2 0,9926	YADAV, G.D. and LATHI, P.S. (80)
Ácido butírico Alcohol amílico	<i>Candida rugosa</i> Inmovilizada	Iso-octano	Ping Pong Bi Bi con inhibición por alcohol amílico	$V_{m\acute{a}x}$ (μ mol/ min g _{enz}) 167 K_{A_i} (mol/dm ³) 0,75 K_{Ac} (mol/dm ³) 0,06 K_{i,A_i} (mol/dm ³) 0,02 $K_{s,Ac}$ (dm ³ /min g) 55,7 $\times 10^{-3}$ K_{s,A_i} (dm ³ /min g) 4,45 $\times 10^{-3}$	BEZBRADICA, D. <i>et al.</i> (17)
Ácido láurico Citronelol	<i>Candida antartica</i> <i>Novozym SP 435</i>	Heptano	Ordenado Bi Bi con complejo dead end por ácido láurico	$V_{m\acute{a}x}$ (mol/ L min g _{enz}) 10,5531 K_i (mol/ L g _{enz}) 1,6641 K_A (mol/ L g _{enz}) 38,9845 K_B (mol/ L g _{enz}) 25,3566	AL-ZUHAIR S. (8)
Alcoholes alifáticos C ₁ -C ₁₈ Ácido láurico	<i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Lipolase 100L</i>	Isooctano	Ping Pong Bi Bi sin inhibición por sustrato y producto	V_{m2} ($\times 10^{-4}$ 1/ s) 1,8 K_{m4} ($\times 10^2$ cm ³ /mol) 1,4 K_{m5} ($\times 10^{-1}$ cm ³ /mol) 9,4	SHINTRE, M. S., GHADGE R. S and. SAWANT. S. B. (75)
Ácido palmítico Alcohol isopropílico	<i>Candida antartica</i> <i>Novozym SP 435</i>	Libre de solvente	Ordenado Bi Bi con inhibición competitiva por sustratos y productos	Enzymatic síntesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. Enzyme and Microbial Technology 25 (1999) 584 -590	GARCIA, T. <i>et al.</i> (34)
Ácido Oleico Etanol	<i>Rhizomucor miehei inmovilizada</i>	Hexano	Ping Pong Bi Bi con inhibición por exceso de etanol	Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexano. FEBS 09208 (1990) 181 -184	CHULALAKSANANUKUL, W et al. (23)

ANEXO 5

REACCIONES DE ALCOHÓLISIS					
SUSTRATOS	ENZIMA	SISTEMA DE REACCIÓN	MECANISMO	CONSTANTES CINÉTICAS	REFERENCIAS
Aceite de palma Metanol	<i>Mucor miehei</i> libre	n-hexano	Ping Pong Bi Bi con inhibición por los dos sustratos	V_{max} (mol/m ³ min) 0,041 K_S (mol/m ³) 430 K_A (mol/m ³) 350 K_{IS} (x10 ⁴ mol/m ³) 4,45 K_{IA} (x10 ⁴ mol/m ³) 3.3	AL-ZUHAIR, S. <i>et al.</i> (9)
Aceite de oliva negro oscuro obtenido como residuo de la destilación Etanol	<i>Candida antarctica</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Dodecano	Modelo Uni-respuesta derivado de el mecanismo generalizado de Michaelis-Menten	Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study	TORRES, F. C. <i>et al.</i> (79)
Triacetina Tricaprilina Propanol Iso-propanol	<i>Candida antarctica</i> <i>Novozym SP 435</i>	Libre de solvente	Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol	Kinetic model of 1,3 – specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipase	PILAREK, M. <i>et al.</i> (66)
Aceite de soya refinado Metil acetato	<i>Candida antarctica</i> <i>Novozym SP 435</i>	Libre de solvente	Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por sustrato	V_{max} (mol/l min) 1,9 K_{mTG} (mol/l) 1 K_{mA} (mol/l) 16 K_i (mol/l) 0,0455	XU Y., DU W. and LIU D. (85)
Aceite de girasol Metanol	<i>Rhizomucor miehei</i> inmovilizada <i>Thermomyces lanuginosus</i> inmovilizada	Libre de solvente	Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol	Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study	AL-ZUHAIR S. (8)
Etil Butanoato Butanol	<i>Mucor miehei</i> inmovilizada Lipozyme™	n-hexano	Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva por uno de los sustratos	v_f (x10 ⁴ mol/l h) 1,522 v_r (x10 ⁰ mol/l h) 2,111 K_{eq} (x10 ⁻¹) 4,927 $K_{m,BuOH}$ (x10 ⁻¹ mol/l) 7,030 $K_{m,EtBu}$ (x10 ⁻² mol/l) 2,682 $K_{i,BuOH}$ (x10 ⁻³ mol/l) 6,809 $K_{m,EtOH}$ (x10 ⁻³ mol/l) 8,039 $K_{m,BuBu}$ (x10 ⁰ mol/l) 0,000 $K_{m,BuOH}$ (x10 ⁻¹ mol/l) 7,030 $K_{i,EtBu}$ (x10 ⁻³ mol/l) 7,591 $K_{i,EtOH}$ (x10 ⁻³ mol/l) 1,620	PAIVA, A.L; ROSSUM, D.V. and MALCATA, F.X. (63)