AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIHIDROCINÁMICO CON DODECANOL EN SOLVENTES ORGÁNICOS

EDWARD MAURICIO MÉNDEZ DÍAZ
GERARDO GAMBOA GONZALEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015

AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIHIDROCINÁMICO CON DODECANOL EN SOLVENTES ORGÁNICOS

EDWARD MAURICIO MÉNDEZ DÍAZ
GERARDO GAMBOA GONZALEZ

Trabajo de grado para optar al título de
Ingeniero Químico

Director:
LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO
Ingeniero Químico, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015

Dedicado a:

Dios *por todas sus bendiciones y fortaleza para superar los obstáculos.*
Mis padres ***Mary*** *y* ***Mauricio****, por su amor y apoyo incondicional durante todas las etapas de mi vida.*
Mi hermana ***Karen*** *por alegrar cada momento de mi vida con su carisma.*
Mis ***amigos*** *por todos los momentos inolvidables vividos durante esta travesía.*

Edward M. Méndez Díaz.

Dedico este trabajo a:

***Dios**, que nos provee todo, y sin él, nada es posible.*

*Mis padres **Gerardo y Esperanza**, por su amor incondicional, por su dedicación inquebrantable, por siempre ser mi apoyo y motivación.*

***Stefanía,** por ser el amor de mi vida, por su compañía y tierno consejo cuando más lo he necesitado.*

Gerardo Gamboa González

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por brindarnos una formación integral.

A nuestro director, el profesor Luis Javier López por su tiempo, constante guía, y valiosos aportes durante el desarrollo de todo el proyecto.

A los miembros del grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) por abrirnos sus puertas, su apoyo constante y enseñanzas durante el desarrollo del proyecto.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por el apoyo económico ofrecido a través del proyecto de investigación titulado: “LIPOFILIZACION DE POLIFENOLES PROPIOS DE LA FILIAL CACAO (CATEQUINAS) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, código interno 1318.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN 14

1. METODOLOGÍA 21

1.1 EQUIPOS Y REACTIVOS 21

1.1.1 Reactivos 21

1.1.2 Equipos 21

1.2 MÉTODOS UTILIZADOS 21

1.2.1 Activación del Catalizador 21

1.2.2 Acondicionamiento y preparación de las muestras de interés antes de su cuantificación 22

1.2.2.1 Seguimiento de la concentración de analitos por cromatografía líquida de alta eficiencia (hplc) 22

1.2.2.2 Seguimiento de la concentración de analitos por cromatografía de gases (gc).....23

1.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....23

1.3.1 Fase 1: Estudio preliminar de la carga enzimática.....24

1.3.2 Fase 2: Estudio de la influencia de la agitación en velocidad inicial de reacción. 24

1.3.3 Fase 3: Optimización de las Condiciones de Reacción 25

1.3.4 Fase 4: Ajuste de parámetros cinéticos y evaluaicón del modelo.....25

2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 28

2.1 CARGA ENZIMATICA 28

2.2 CALCULO DE LA VELOCIDAD INICIAL 29

2.3 EFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL 30

2.4 ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN.....31

2.5 AJUSTE DE LOS PARAMETROS CINÉTICOS.....33

2.5.1. Evaluación del modelo cinético.....35

3. CONCLUSIONES.....38

4. RECOMENDACIONES.....39

BIBLIOGRAFÍA.....40

ANEXOS 46

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Mecanismo de acción de la lipasa como catalizador en reacciones de esterificación. 18
Figura 2. Diagrama del mecanismo cinético de Ping-Pong sin inhibición. Donde A hace referencia al ácido dihidrocaféico, B al alcohol, P al agua, Q al éster formado; E, EA, F, y FB hacen referencia a la enzima y a los complejos enzimáticos. 19
Figura 3. Reacción de esterificación del ácido 3,4-Dihidroxihidrocinámico con 1-Dodecanol. 20
Figura 4. Esquema metodológico. 23
Figura 5. Cambio del rendimiento del éster en el tiempo con diferente carga enzimática (11, 20, 31, 62%). 29
Figura 6. Cambio de la concentración del éster en el tiempo para una carga enzimática del 31%. 30
Figura 7. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad inicial. 31
Figura 8. Diagrama de Pareto para el rendimiento de éster. 32
Figura 9. Diagrama de efectos principales para el rendimiento de éster. 32
Figura 10. Superficie de ajuste del modelo de inhibición por éster a 40°C y relación molar dodecanol:ácido 5:1 35

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Diseño de superficie de respuesta. 25
Tabla 2. Modelos cinéticos propuestos para ajustar el comportamiento de la reacción de esterificación entre el ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico y 1-dodecanol. 26
Tabla 3. Cálculo de velocidad inicial de reacción. 30
Tabla 4. Condiciones óptimas de operación de la reacción de esterificación. 33
Tabla 5. Coeficiente de determinación (R^2) y porcentaje de error medio absoluto (PEMA) para cada uno de los modelos evaluados. 34
Tabla 6. Parámetros ajustados del modelo de inhibición por producto. 34
Tabla 7. Parámetros del modelo cinético de inhibición por producto en condiciones óptimas. 36
Tabla 8. Rendimiento del éster en condiciones óptimas de reacción. 36

LISTA ANEXOS

Pág.

ANEXO A. Cromatogramas y curvas de calibración.....46
ANEXO B. Pesos de la variable dependiente y descriptores de error 49
ANEXO C. Desarrollo matemático del modelo de ping pong bi bi sin inhibición..50
ANEXO D. Ecuaciones de ajuste de los parámetros cinéticos en función de la temperatura y relación molar 54
ANEXO E. Ecuaciones de ajuste del ácido en función de la temperatura y relación molar.....56

RESUMEN

TITULO: AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIHIDROCINÁMICO CON DODECANOL EN SOLVENTES ORGÁNICOS*

AUTORES: EDWARD MAURICIO MÉNDEZ DÍAZ, GERARDO GAMBOA GONZALEZ**

PALABRAS CLAVE: Catálisis enzimática, Novozym 435®, inhibición por producto, parámetros cinéticos.

Los modelos cinéticos son herramientas útiles en el diseño de procesos biocatalíticos, escalamiento y optimización con el fin de mejorar la productividad. Los ácidos cinámicos son antioxidantes naturales con gran potencial para remplazar moléculas artificiales, pero presentan baja solubilidad en matrices lipídicas, la cual se mejora mediante adición de cadenas alifáticas de alcoholes grasos a la estructura del ácido por esterificación. Se estudió la reacción de esterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico con dodecanol catalizada por Novozym 435® en medio orgánico compuesto de hexano y butanona en relación volumétrica 65:35, 31% de carga enzimática, 96 horas de reacción y agitación de 450 rpm donde la limitación de transferencia de masa externa presentó menor efecto. Se optimizaron las variables temperatura y relación molar mediante una metodología de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas fueron: temperatura de 54°C y relación molar dodecanol:ácido de 4:1. El rendimiento máximo de dihidrocafeato de dodecilo fue de 68,24%. Diferentes modelos cinéticos derivados del mecanismo Ping Pong Bi Bi fueron probados para ajustar el comportamiento de la reacción de esterificación y se encontró que el modelo de inhibición por producto proporcionaba el mejor ajuste. Finalmente se evaluó el modelo cinético en las condiciones óptimas con los parámetros estimados V_m=0,668 mM/h, K_{i1}=1,491 mM^{-1}, K_{i2}=0,325 mM^{-2}, K_m=0,186 mM obteniendo un rendimiento predicho de 70,52% con un error de 3,3% respecto al rendimiento obtenido del análisis estadístico.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo

ABSTRACT

TITLE: FITTING THE KINETIC PARAMETERS OF THE ENZYMATIC ESTERIFICATION OF 3,4-DIHYDROXYHYDROCINNAMIC ACID WITH DODECANOL IN ORGANIC SOLVENTS*

AUTHORS: EDWARD MAURICIO MÉNDEZ DÍAZ, GERARDO GAMBOA GONZALEZ**

KEY WORDS: enzymatic catalysis, Novozym 435®, product inhibition, kinetic parameters.

Kinetic models are useful tools in the design of biocatalytic processes, scaling and optimization in order to improve productivity. Cinnamic acids are natural antioxidants with great potential to replace artificial molecules, but presents low solubility in lipids, which can be enhanced by adding aliphatic chains of fatty alcohols to the structure of the acid trough esterification. The esterification reaction of 3,4-dihydrohydrocinnamic acid with dodecanol catalyzed by Novozym 435® was studied in organic media composed by hexane and butanone 65:35 volume ratio, 31% enzyme load, 96 hours and 450 rpm where the limitation of external mass transfer showed less effect. The variables of temperature and molar ratio were optimized with response surface methodology. The optimal conditions were: temperature 54°C and molar ratio (dodecanol:acid) 4:1. The maximum yield of dodecyl dihydrocafeate was 68,24%. Different kinetic models derived of Ping Pong Bi Bi mechanism were tested to fit the behavior of the esterification reaction and product inhibition model was found to provide the best fit. Finally, the kinetic model was evaluated at optimal conditions using the estimated parameters V_m=0,668 mM/h, K_{i1}=1,491 mM^{-1}, K_{i2}=0,325 mM^{-2}, K_m=0,186 mM obtaining a predicted yield of 70.52% with an error of 3.3% compared to the yield obtained from the statistical analysis.

* Degree Work

** Physical and chemical engineering faculty. Chemical engineering department. Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo

INTRODUCCIÓN

La implementación de antioxidantes en la industria cosmética y de alimentos exhibe un aumento debido a la necesidad de retardar los procesos oxidativos causados por diversos factores y proteger componentes liposolubles, tales como vitaminas o carotenoides, aceites y grasas; asegurando la calidad en los productos. Muchos compuestos se han usado como antioxidantes, incluyendo principalmente sustancias fenólicas artificiales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroquinona (TBHQ); sin embargo, su uso ha sido restringido en algunos países debido a la evidencia que sugiere que dichas sustancias tienen efectos tóxicos y cancerígenos (Zhang, 2014).

La tendencia actual hacia el uso de compuestos naturales ha fomentado interés en la investigación de nuevas moléculas antioxidantes de fácil obtención y que presenten altos rendimientos; entre ellas se encuentran los ácidos fenólicos, que son sustancias originadas principalmente en las plantas como producto de su metabolismo secundario en donde se presentan como ésteres de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas (Quiñones *et al.,* 2012).

Una de las limitantes en la aplicación de antioxidantes naturales es su baja solubilidad en medios hidrofóbicos. La estrategia para sobrepasar esta restricción consiste en la adición de cadenas alifáticas de alcoholes grasos a la estructura del ácido fenólico mediante una reacción de esterificación, con el fin de mejorar no solo las propiedades físicas como la solubilidad y miscibilidad, sino también para mantener la actividad antioxidante y disminuir costos en la formulación de productos de base emulsionada o lipídica, debido a un menor requerimiento de moléculas antioxidantes como consecuencia del aumento de su solubilidad (Buisman *et al*., 1998).

El ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico, es un ácido fenólico que se encuentra dentro de la clasificación de los ácidos cinámicos y es considerado una molécula biológicamente amigable gracias a que es extraída de ciertas frutas y verduras (Kim *et al*., 2005). También es conocido como ácido dihidrocaféico y es un compuesto de gran interés debido a su prometedora actividad biológica como agente antioxidante, agente anticancerígeno y de fotoprotección (Poquet *et al*., 2008). La actividad antioxidante de sus ésteres también ha sido estudiada mostrando que sus beneficios se mantienen luego de la adición de cadenas alquílicas facilitando su aplicación en emulsiones y matrices netamente lipídicas (Sorensen *et al*., 2012 y García, 2015).

Tradicionalmente, los ésteres son preparados mediante síntesis química implementando catalizadores inorgánicos, en donde se presenta baja selectividad, reacciones indeseables y el uso de sustancias químicas nocivas. Como alternativa a esta ruta de síntesis se encuentra la biocatálisis; la cual consiste en la implementación de enzimas como catalizadores. Diversos estudios demuestran que las lipasas son las más indicadas en este tipo de reacciones debido a que presentan mejores rendimientos, alta selectividad para el producto esterificado con mejora de pureza y calidad (Sabally, 2005; López *et al*., 2007a; López *et al.,* 2007b). Las lipasas son enzimas de gran importancia en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética por sus múltiples aplicaciones debido a que llevan a cabo reacciones de hidrólisis, esterificación, transesterificación e interesterificación. Las lipasas han sido encontradas en muchas especies de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características interesantes como estabilidad en solventes orgánicos, alta especificidad de sustrato y condiciones suaves de operación (Castañeda *et al.*, 2012). La lipasa *Candida antartica* B, conocida comercialmente como Novozym 435®, es un biocatalizador enzimático de tipo microbiano eficiente en reacciones de esterificación de ácidos cinámicos y sus derivados (Vosmann *et al.*, 2006; López *et al.,* 2007b). Esta enzima ha sido implementada como catalizador en la mayoría de

investigaciones que involucran reacciones de esterificación y transesterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico (Yang *et al*., 2011; Yang *et al*., 2012; Sabally *et al.*, 2007).

Una de las metodologías desarrolladas en el uso de Novozym 435®, es la implementación de un solvente orgánico binario que permite mejorar la solubilidad de los ácidos fenólicos en el medio de reacción, mantener la máxima actividad de la enzima y cambiar el equilibrio termodinámico de la reacción para favorecer la síntesis del producto deseado (Sabally *et al.*, 2005a). De acuerdo con los resultados obtenidos por Yang *et al.* (2012) la mezcla de solventes más eficiente en la esterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico con diferentes tipos de alcohol, es hexano y butanona en relación volumétrica de 65:35. Otra de las formas de desplazar el equilibrio termodinámico es la implementación de tamices moleculares con el fin de retirar el agua formada durante la reacción (Akoh, 1993).

En la investigación realizada por García (2015) se determinó la capacidad antioxidante de ésteres sintetizados a partir del ácido 3,4–dihidroxihidrocinámico mediante esterificación enzimática con cuatro alcoholes grasos saturados de diferente longitud de cadena alifática. Los ésteres producidos fueron evaluados por dos técnicas para determinar su capacidad antioxidante (ORAC Lipofílico) y antirradicalaria (DDPH). Los compuestos que mostraron mayor capacidad antioxidante fueron el dihidrocafeato de butilo y el dihidrocafeato de dodecilo; los cuales se implementaron posteriormente en el enriquecimiento de dos muestras de aceite de palma comercial, las cuales también fueron sometidas a análisis de capacidad antioxidante mediante el método ORAC lipofílico, y se obtuvo como resultado que el dihidrocafeato de dodecilo presenta gran afinidad con la matriz lipídica y mejor capacidad para proteger el aceite contra radicales libres; por tanto es un compuesto promisorio para una futura aplicación en industrias donde esté involucrada la formulación de productos de base lipídica o emulsionada.

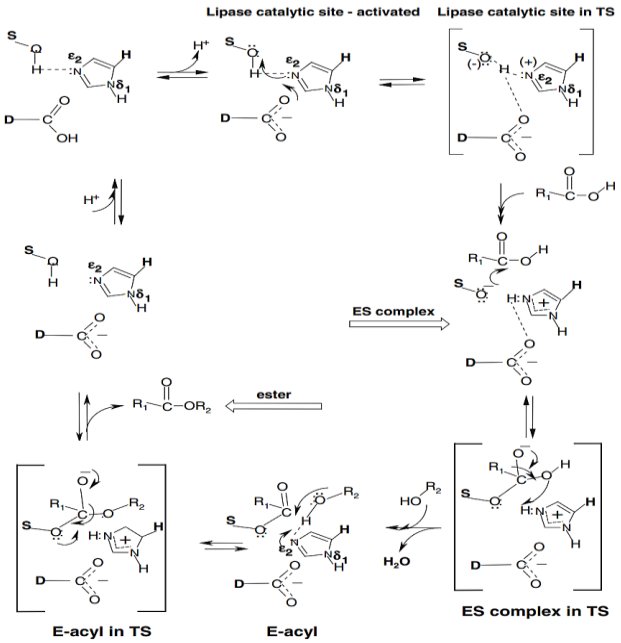
El escalamiento de procesos amigables con el entorno y que generen productos funcionales con valor agregado es uno de los mayores intereses a nivel industrial. Para logar dicho propósito, es necesario contar con modelos matemáticos que describan adecuadamente los cambios físicos y/o químicos; y que a su vez sean confiables, sencillos y funcionales (Bornadel *et al*., 2013). Los modelos cinéticos son las herramientas usadas para facilitar el diseño de reacciones biocatalíticas, así como para lograr su optimización, control y escalamiento con el fin de mejorar la productividad y reducir costos de producción (Bornadel *et al*., 2013).

Los mecanismos enzimáticos de reacción están directamente relacionados con la estructura de la enzima. Algunas enzimas catalizan reacciones de un único sustrato, otras poseen centros activos complejos y son capaces de catalizar reacciones con más de dos sustratos para formar uno o más productos (Alberty 2010). El número de sustratos proporciona pistas sobre el tipo de mecanismo de reacción que sigue la enzima. Los mecanismos cinéticos de una reacción enzimática hacen referencia al orden de adición y liberación de sustratos y productos respecto a la enzima, de acuerdo a esto, se pueden mencionar dos categorías: mecanismos secuenciales y no secuenciales.

Los mecanismos secuenciales se caracterizan porque ambos sustratos deben unirse a la enzima antes de liberar los productos, dentro de esta categoría se encuentran los mecanismos ordenados y aleatorios. En los mecanismos ordenados la enzima posee un sitio para la unión del sustrato A, formando un complejo enzimático EA, creando así otro sitio para la unión del sustrato B y luego de la formación de un complejo ternario la reacción ocurre cuando se libera el producto. En los mecanismos aleatorios la enzima posee distintos sitios de unión para cada uno de los sustratos, es decir, un sustrato se puede añadir a la enzima antes o después de otro; lo mismo ocurre para la liberación de productos (Ulusu, 2015).

De acuerdo a investigaciones previas, las lipasas siguen el mecanismo de Ping Pong Bi Bi (Martinelle *et al*, 1995); el cual se clasifica dentro de los mecanismos no secuenciales y también es conocido como mecanismo de reacción de doble desplazamiento. El mecanismo consiste en la interacción de la enzima libre y el ácido para formar un intermedio acil-enzima, seguido por la liberación de una molécula de agua; posteriormente se da un ataque nucleofílico por parte del alcohol para formar el éster deseado, liberando finalmente la enzima en su forma inicial como se muestra en la figura 1. Estudios cinéticos realizados por diferentes autores en reacciones de esterificación enzimática corroboran que el uso del mecanismo de Ping Pong Bi Bi es adecuado en este tipo de reacciones biocatalíticas; sin embargo, la presencia de sustratos y productos en el medio de reacción puede ocasionar diferentes tipos de inhibición en la enzima. Por tal motivo los modelos son replanteados con el fin de incluir el efecto dichos tipos de inhibición en la ecuación matemática.

Figura 1. Mecanismo de acción de la lipasa como catalizador en reacciones de esterificación.

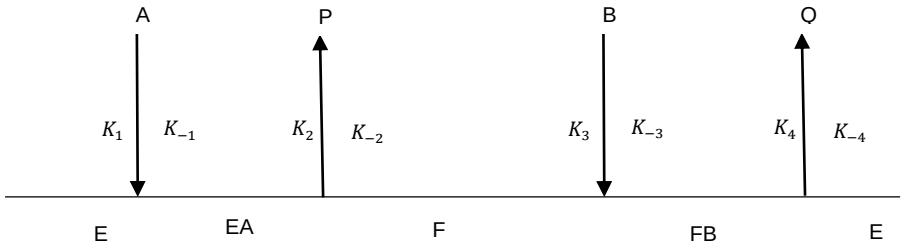


Fuente: Modificación por Gandhi *et al*. (2000) y Kokkinou *et al*. (2012).

Por ejemplo, Kraai *et al.*, (2008), evaluaron el ajuste de los parámetros de reacción catalizada por lipasa del ácido oleico y butanol en solventes orgánicos; y obtuvieron como mejor modelo el mecanismo de Ping Pong con inhibición del butanol. Otros investigadores como Itabaiana *et al.* (2013), encontraron que el modelo de Ping Pong con inhibición por ácido presentaba el mejor ajuste en la reacción de ácido esteárico con glicerol catalizada por lipasas. Oliveira *et al.,* (2001) propusieron un modelo sencillo; es decir, sin ningún tipo de inhibición en la esterificación enzimática de ácido oleico con etanol. Lopresto *et al*., (2014), evaluaron la esterificación enzimática del ácido octanóico y hexanol usando Novozym 435® como catalizador, y encontraron que el mejor ajuste fue el obtenido por el modelo de Ping Pong con inhibición por ambos sustratos. Por otro lado, Kriti *et al.,* (2012) encontraron que la esterificación de ácidos grasos extraídos de atún con butanol se ajustaba a un modelo por inhibición de éster.

El esquema propuesto por Cleland (1963) para el mecanismo de Ping Pong Bi Bi mostrado en la figura 2; permite la obtención de ecuaciones diferenciales en función de las constantes cinéticas de cada paso de la reacción para finalmente llegar a la ecuación de velocidad de formación de éster en función de parámetros cinéticos que muestran un significado físico de la reacción.

Figura 2. Diagrama del mecanismo cinético de Ping-Pong sin inhibición. Donde A hace referencia al ácido dihidrocaféico, B al alcohol, P al agua, Q al éster formado; E, EA, F, y FB hacen referencia a la enzima y a los complejos enzimáticos.



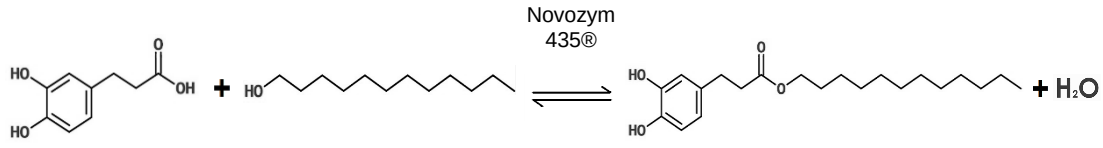
La ecuación 1, derivada del esquema del mecanismo Ping Pong Bi Bi, muestra la velocidad de formación de éster en función de las concentraciones de ácido y alcohol.

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\frac{[A][B]V\mathrm{m}}{[A][B]+[A]K_{mB}+[B]K_{mA}}\right) \qquad (1)$$

El numerador de la ecuación de velocidad representa la fuerza impulsora de la reacción y el denominador representa la distribución de la enzima entre sus varias formas. Los parámetros $\mathrm{Vm}, \mathrm{K_{mA}}$ y $\mathrm{K_{mB}}$ corresponden respectivamente a la velocidad máxima de reacción y a las constantes de afinidad de Michaelis para cada uno de los sustratos.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos por García (2015), este proyecto de investigación pretende optimizar las condiciones de la esterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinamico con 1-dodecanol en solvente orgánico binario utilizando Novozym 435® como catalizador; y cuantificar el comportamiento de los sustratos y producto en el tiempo para finalmente proponer y ajustar un modelo cinético que describa el comportamiento de la reacción mostrada en la figura 3.

Figura 3. Reacción de esterificación del ácido 3,4-Dihidroxihidrocinámico con 1-Dodecanol.



Ácido 3,4-Dihidroxihidrocinámico (Ácido Dihidrocaféico) | Dodecanol | Dihidrocafeato de dodecilo

1. METODOLOGÍA

1.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

1.1.1 Reactivos. Para el desarrollo experimental fueron utilizados los siguientes reactivos: ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico marca Sigma-Aldrhich con 98% de pureza, 1-dodecanol marca Merck con 98% de pureza, Novozym 435® (*Candida Antártica* lipasa B; enzima inmovilizada en resina acrílica, con actividad >5000 U/g) marca Sigma-Aldrhich, tamices moleculares de tamaño de poro de 3Å marca Sigma-Aldrhich, hexano marca Merck con 98,5% de pureza, butanona con 99% de pureza marca Panreac AppliChem, cloruro de Magnesio hexahidratado marca Merk.

1.1.2 EQUIPOS

- HPLC Dionex Ultimate 3000. Thermo scientific con detector UV-Vis
- Cromatógrafo de gases AGILENT TECHNOLOGIES, referencia 7890ª
- Estufa Marca Binder
- Balanza Analítica AB204-S marca Mettler-Toledo
- Agitador Vortex marca SchottGerate
- Agitador orbital analógico Vibramax 100 marca HEIDOLPH

1.2 MÉTODOS UTILIZADOS

1.2.1. Activación del Catalizador. El primer paso para realizar una reacción de esterificación catalizada por enzimas en medio orgánico es garantizar la activación de la enzima (Stergiou *et al*., 2013), la cual se lleva a cabo mediante un pre-equilibrio con sales de diferente actividad de agua (a_w) (Sabbani *et al*., 2009) permitiendo una mayor movilidad conformacional del catalizador.

Para el caso de la lipasa B de *cándida antártica,* la actividad de agua de 0,33 del cloruro de magnesio hidratado permitió una buena activación en un periodo de 15 días; empleando un desecador hermético (García, 2015). Este valor se escogió porque existe evidencia que a estas condiciones la lipasa alcanza una configuración que favorece las reacciones de esterificación (Duan *et al*., 2010).

1.2.2 Acondicionamiento y preparación de las muestras de interés antes de su cuantificación. Debido a que es necesario que el diseño experimental asegure la independencia de las variables que serán utilizadas en el ajuste del modelo cinético (Bowden, 2014), se implementaran dos técnicas analíticas de cromatografía (anexo A) para la cuantificación de los compuestos de interés.

Las muestras a ser analizadas por cromatografía líquida (HPLC) y de gases, fueron alícuotas tomadas del medio de reacción entre 50 a 100 µl llevadas a un 1 ml con acetonitrilo, agitadas durante 1 minuto a 2000 rpm, posteriormente se realizó una segunda dilución tomando volúmenes entre 50 y 200µl de la dilución inicial y nuevamente se llevaron a 1 ml con acetonitrilo. La segunda dilución fue agitada igual que la inicial y pasó por un filtro de 13 mm PTFE de tamaño de poro 0,45µm antes de ser analizadas por HPLC y GC.

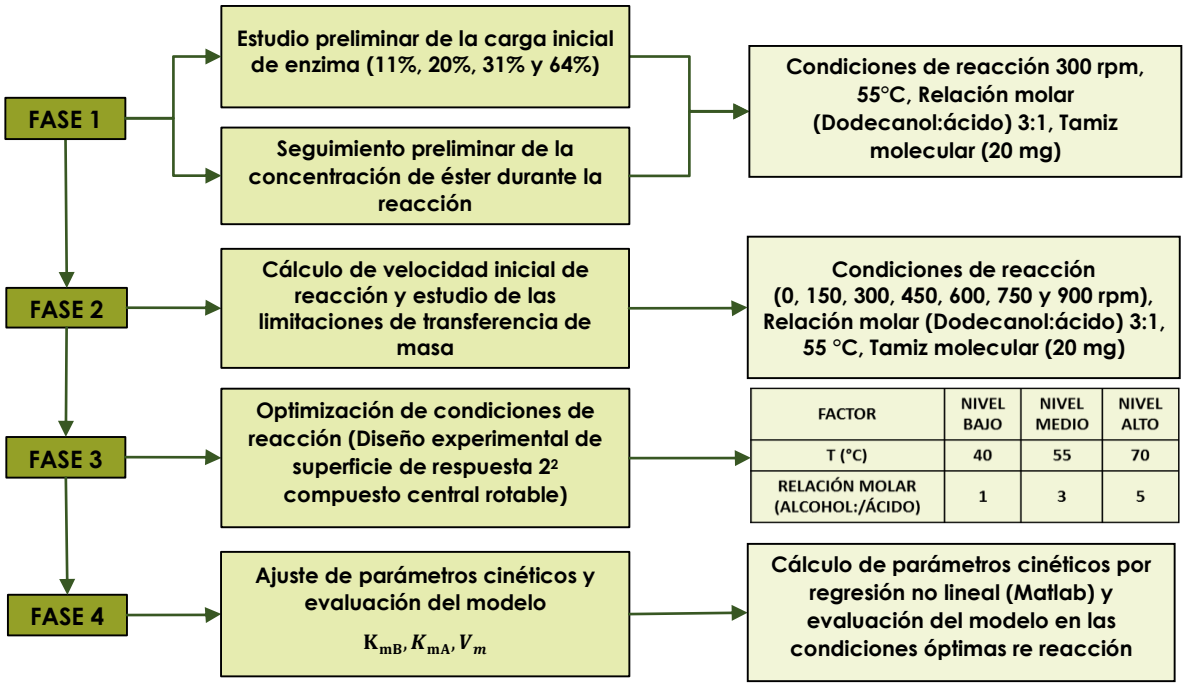
1.2.2.1 Seguimiento de la concentración de analitos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cuantificación del ácido consumido y del éster formado se desarrolló por HPLC usando el método propuesto por Sabally *et al*. (2005) con ligeras modificaciones. Brevemente, el equipo utilizó una columna RP-C18 (250mm x4,6 mm, 5µm), operando de modo isocrático con un flujo de acetonitrilo de 1 ml/min durante 15 min. La longitud de onda a la cual se realizó la cuantificación fue 284 nm (Yang *et al*., 2011). Las áreas de los picos correspondientes al ácido y el éster fueron cuantificadas empleando el método de estándar externo, usando curvas de calibración (Anexo A).

1.2.2.2 Seguimiento de la concentración de analitos por cromatografía de gases (GC). El cambio en la concentración del alcohol se cuantificó mediante cromatografía de gases (GC). El análisis se desarrolló bajo la modificación del método propuesto por Bhandari *et al*. (2013). Brevemente, se usó una columna HP-88 (60m x250µm x0,2µm), temperatura del detector e inyector de 250°C, con temperatura inicial del horno de 50°C, rampa de calentamiento de 3 °C/min hasta 90°C y se utilizó hidrógeno como gas de arrastre. El área del pico correspondiente al alcohol fue cuantificada empleando el método de estándar externo, usando curva de calibración (Anexo A).

1.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El esquema metodológico mostrado en la figura 4 representa el desarrollo experimental que siguió el presente trabajo.

Figura 4. Esquema metodológico.



1.3.1 Fase 1: estudio preliminar de la carga enzimática. Se realizó seguimiento del rendimiento del éster utilizando diferentes cargas enzimáticas con el fin de determinar la cantidad de enzima adecuada para desarrollar las fases posteriores del proyecto. Se implementaron porcentajes másico de 11, 20, 31 y 62% de enzima de acuerdo a la masa total de los sustratos.

La reacción se llevó a cabo a una concentración de ácido de 50 mM, en un volumen de 2ml a 96 horas, relación molar dodecanol:ácido de 3:1, temperatura de 55°C, agitación de 300 rpm, medio orgánico de hexano:butanona en relación 65:35 v/v y 20 mg de tamiz molecular. Estas condiciones son una modificación de las condiciones optimizadas en el estudio realizado por Yang *et al.* (2012).

1.3.2 Fase 2: estudio de la influencia de la agitación en velocidad inicial de reacción. Con el fin de despreciar las limitaciones de transferencia externas asociadas a la inmovilización de la enzima (Díaz Fernández., 2012) se propuso una serie de experimentos donde la variable de respuesta fue la velocidad inicial (V_o) y la variable manipulada fue la agitación; esta se modificó desde 0 hasta 750 rpm. El objetivo de esta experimentación fue identificar una región a partir de la cual el aumento de la agitación no represente cambios en V_o (Kraai *et al.*, 2008) o encontrar un valor de agitación donde V_o sea máximo (Zhuzhen *et al.*, 2013).

La estimación de la velocidad inicial incluyó el ajuste matemático del comportamiento cinético de la aparición del dihidrocafeato de dodecilo y el cálculo de la derivada de la función ajustada evaluada en el tiempo cero. El tiempo de reacción y la carga enzimática empleados son tomados de acuerdo a la fase anterior; las demás condiciones de reacción se mantienen constantes.

1.3.3 Fase 3: optimización de las condiciones de reacción. En esta fase se estudió la influencia de los factores temperatura y relación molar de sustratos, sobre el rendimiento del éster durante la reacción. El diseño experimental implementado fue de superficie de respuesta 2^2 compuesto central rotable. Los niveles de temperatura y relación molar (incluyendo el punto central y los puntos axiales) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño de superficie de respuesta.

	Niveles				
Variables	-1,682	-1	0	1	1,682
Temperatura °C	34	40	55	70	76
Relación Molar (Dodecanol:ácido)	0,17	1	3	5	5,83

Las demás condiciones reaccionantes (carga enzimática, agitación, volumen, cantidad de tamiz y tiempo) se mantuvieron constantes en los valores obtenidos en las etapas anteriores. Se realizaron muestreos de cada experimento a 0, 8, 16, 24, 36, 48 y 96 horas de reacción para obtener datos del comportamiento en el tiempo de las sustancias involucradas en la reacción con el fin de ajustar los parámetros cinéticos en la siguiente fase. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

1.3.4 Fase 4: ajuste de parámetros cinéticos y evaluación del modelo. En esta etapa se analizó el comportamiento cinético de sustratos y producto con el fin de proponer modelos matemáticos que describan el comportamiento de la reacción de esterificación. Posteriormente se ajustaron los parámetros cinéticos de cada modelo mediante regresión no lineal utilizando la herramienta Curve Fitting del software MATLAB versión R2013a; la cual implementa el método de mínimos cuadrados no lineales y el algoritmo *Trust-region*. En el ajuste se incluyeron los pesos de la variable dependiente con el fin de penalizar los experimentos con menor

confiabilidad, estos valores se calcularon como se muestra en el Anexo B. Finalmente, se evaluó la bondad de ajuste de cada modelo empleando el coeficiente de determinación (R^2) y el porcentaje de error medio absoluto (PEMA).

Las ecuaciones mostradas en la tabla 2 corresponden a los modelos cinéticos evaluados en este trabajo, los cuales fueron desarrollados a partir del esquema y la nomenclatura de Cleland (1963) Anexo C. Las letras A y B corresponden a los sustratos ácido y alcohol; P y Q son los productos agua y éster; V_m corresponde a la velocidad máxima, K_{mA} y K_{mB} corresponden a las constantes de afinidad para cada sustrato; K_{iA}, K_{iB}, K_{i1} y K_{i2} corresponden a las constantes de inhibición de cada sustrato, y de primer y segundo orden para el producto.

Tabla 2. Modelos cinéticos propuestos para ajustar el comportamiento de la reacción de esterificación entre el ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico y 1-dodecanol.

Modelo cinético	Ecuación
Modelo Ping Pong Bi Bi sin inhibición (Segel., 1975)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A][B]V_m}{[A][B]+[A]K_{mB}+[B]K_{mA}}\right)$
Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por sustrato A. (Kraai *et al.,*2008)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A][B]V_m}{[A][B]+[B]K_{mA}+[A]K_{mB}\left(1+\frac{[A]}{K_{iA}}\right)}\right)$
Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por sustrato B. (Zhang *et al*.,2013; Itabaiana *et al*.,2013; Duan *et al*.,2010)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A][B]V_m}{[A][B]+[A]K_{mB}+[B]K_{mA}\left(1+\frac{[B]}{K_{iB}}\right)}\right)$
Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por ambos sustratos. (Lopresto *et al*.,2014; Krishna *et al*.,2001)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A][B]V_m}{[A][B]+[B]K_{mA}\left(1+\frac{[B]}{K_{iB}}\right)+[A]K_{mB}\left(1+\frac{[A]}{K_{iA}}\right)}\right)$
Modelo complejo ternario. (Bhandari *et al*.,2013.)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A][B]V_m}{[A][B]+[B]K_{mA}+[A]K_{mB}+K_AK_{mB}}\right)$
Modelo Ping Pong Bi Bi inhibición por producto Q (Prazeres *et al.,* 1993)	$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\frac{[A]V_m}{[A]+K_m(1+K_{i1}[Q]+K_{i2}[Q]^2)}\right)$

Finalmente, el modelo cinético con el mayor grado de ajuste se evaluó en las condiciones óptimas de reacción y el resultado obtenido a las 96 horas de reacción se comparó con el resultado obtenido del modelo estadístico.

2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

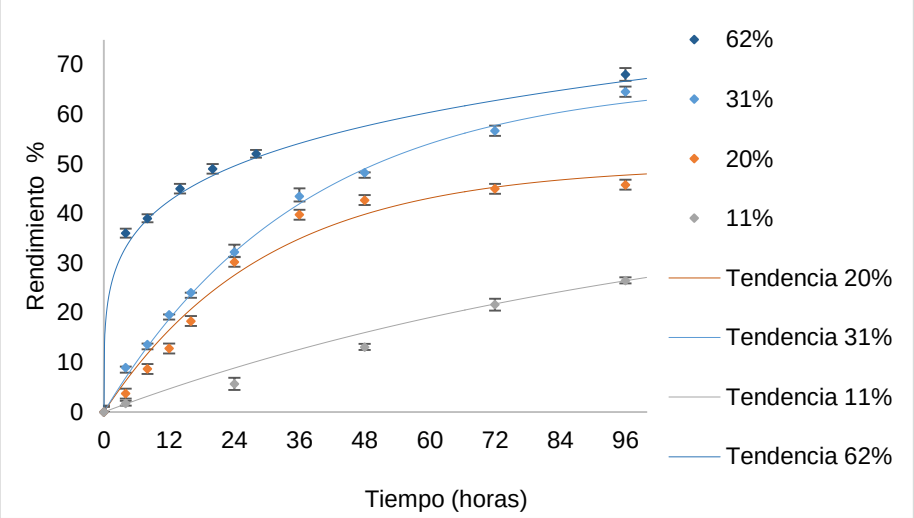
2.1 CARGA ENZIMATICA

Los cambios del rendimiento del éster (respecto a la concentración inicial de ácido) en el tiempo se muestran en la figura 5. Donde se observa que el rendimiento máximo alcanzado a 96 horas para las cargas enzimáticas del 62, 31, 20 y 11% (p/p) fueron respectivamente del 67, 65, 46 y 26%. Los rendimientos obtenidos en este trabajo para las cargas enzimáticas del 62 y 31% (p/p) son cercanos a los rendimientos reportadas por García, (2015) y Yang *et al.,* (2012) a 60°C; los cuales fueron respectivamente 67 y 70% en periodos de reacción de 96 y 120 horas con cargas enzimáticas del 62 y 31% (p/p) respectivamente.

La carga enzimática seleccionada fue la de 31% del peso total de los sustratos debido a que con este valor el rendimiento alcanzado fue muy cercano al alcanzado con la carga del 62% (p/p); en el mismo tiempo de reacción. Lo cual se traduce en una reducción del costo asociado al catalizador sin pérdidas importantes de rendimiento.

Bajo las condiciones de reacción establecidas para la figura 5, y una carga enzimática del 31% (p/p) a un tiempo de esterificación de 192 horas el rendimiento máximo alcanzada fue del 74%, es decir que hubo solamente un incremento de 9 unidades de rendimiento para el doble del tiempo de reacción. Este resultado indica que el tiempo de reacción de 96 horas es suficiente para que el medio de reacción alcance un rendimiento razonable sin generar gastos energéticos innecesarios.

Figura 5. Cambio del rendimiento del éster en el tiempo con diferente carga enzimática (11, 20, 31, 62%).



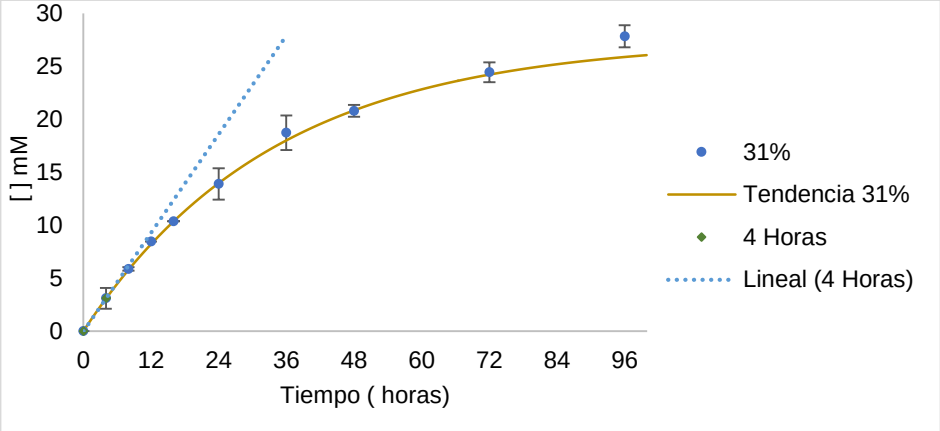
2.2 CALCULO DE LA VELOCIDAD INICIAL

La estimación de la velocidad inicial incluyó el ajuste matemático del comportamiento cinético de la aparición del dihidrocafeato de dodecilo y el cálculo de la derivada de la función ajustada, evaluada en el tiempo cero (Leskovac, 2003).

En la figura 6 se ejemplifica el cálculo empleando un sistema reaccionante con una carga enzimática del 31% (p/p); se aprecia que los valores experimentales siguen un comportamiento exponencial, el cual fue ajustado a una ecuación matemática en función del tiempo (ver ecuación 2) empleando el software CurveExpert Professional 2.3.0 (versión de prueba).

$$\text{CONCENTRACIÓN DE ÉSTER} = 29.3215 * (1 - e^{-0.027108*t}) \quad (2)$$

Figura 6. Cambio de la concentración del éster en el tiempo para una carga enzimática del 31%.



Adicionalmente se realizó el cálculo mediante la aproximación de diferencias finitas; la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos muestra que el error absoluto en el cálculo de la velocidad inicial no fue superior al 3% (Tabla 3).

Tabla 3. Cálculo de velocidad inicial de reacción.

Experimento	V_o calculada analíticamente [mM/h]	V_o calculada por aproximación de diferencias finitas [mM/h]	% Error
Carga enzimática 31%	0,7948	0,775	2,49%

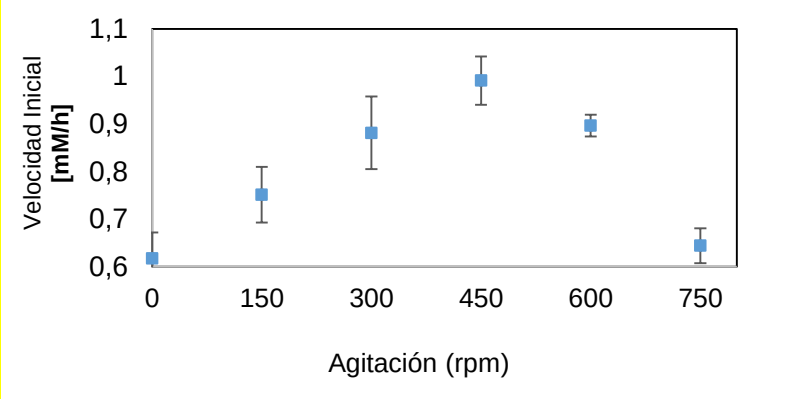
2.3 EFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL

El efecto de la agitación sobre la velocidad inicial se muestra en la figura 7, en donde se identifica un valor máximo de velocidad inicial V_o cuando el sistema de reacción es agitado a 450 rpm, luego de este valor la velocidad inicial decae. Este tipo de

comportamiento ha sido observado previamente por Sun *et al.* (2010) y se debe a la disminución en el contacto entre el medio reaccionante y el catalizador.
En efecto, para altas velocidades de agitación las partículas sólidas, es decir el tamiz y el catalizador, están distribuidas preferencialmente en las paredes del reactor lo que limita su contacto con la fase fluida, limitándose así el contacto entre los reactivos y el catalizador lo que da como resultado una disminución en la velocidad inicial de reacción.

Otras posibles causas de la disminución de la velocidad inicial son la destrucción del catalizador por la acción de cizalla que ejerce el tamiz molecular (Villeneuve, 2007) y la inactivación del catalizador causada por la formación de espuma en el medio de reacción (Raita *et al.*, 2008).

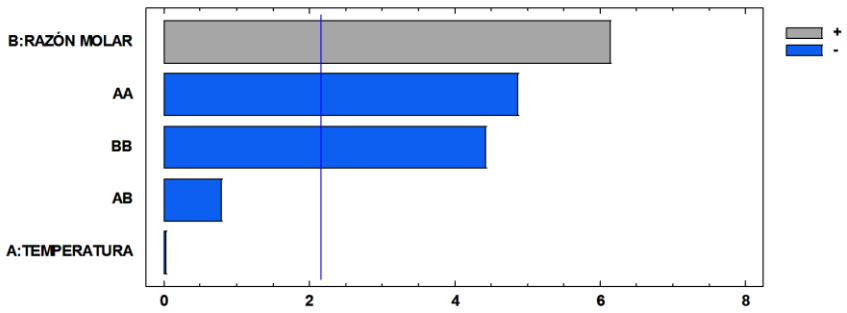
Figura 7. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad inicial.



2.4 ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN

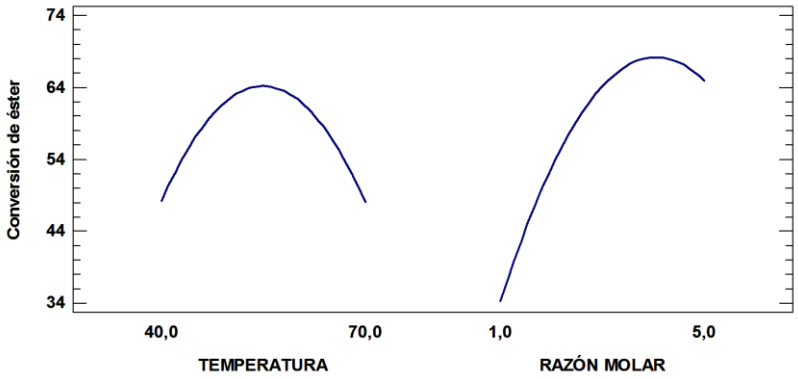
La figura 8 muestra el diagrama de Pareto obtenido para la variable de respuesta: rendimiento de éster.

Figura 8. Diagrama de Pareto para el rendimiento de éster.



En el diagrama de Pareto se presentan los resultados del análisis ANOVA que permite analizar el efecto de los factores individuales y de sus interacciones. En el eje x se encuentran los valores del estadístico t para cada uno de los factores. Valores mayores a 2 indican que el regresor tiene efecto sobre la variable de respuesta. De acuerdo a esto, se observa que la relación molar es la variable que posee mayor efecto; y las interacciones entre AA y BB también muestran alto efecto lo cual indica que hay un punto de inflexión para cada variable como se muestra en la figura 9.

Figura 9. Diagrama de efectos principales para el rendimiento de éster.



De acuerdo a lo anterior las condiciones más favorables para maximizar el rendimiento de éster están dadas a valores de temperatura intermedios y a valores de relación molar entre la mitad y el límite superior. Este resultado gráfico fue

corroborado optimizando la ecuación 3 que describe el comportamiento del rendimiento de éster como función de los factores y sus interacciones. Los valores óptimos de cada variable son mostrados en la tabla 4.

$$\%\ \text{RENDIMIENTO ÉSTER} = -222{,}789 + 8{,}13102 * \text{T} + 34{,}6822 * \text{RM} \\ -0{,}0714306 * \text{T}^2 - 0{,}0930333 * \text{T} * \text{RM} - 3{,}6504 * \text{RM}^2 \quad (3)$$

Donde T hace referencia a la temperatura y RM a la relación molar dodecanol: ácido.

Tabla 4. Condiciones óptimas de operación de la reacción de esterificación.

Factor	**Bajo**	**Alto**	**Óptimo**
Temperatura (°C)	33,79	76,21	54,27
Relación molar (Dodecanol:ácido)	0,17	5,83	4,06
Respuesta			**Óptimo**
Rendimiento de éster			68,24%

Los valores óptimos obtenidos son similares a los calculados por Yang *et al*., (2012) en la optimización de las condiciones de reacción del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico con octanol; las cuales fueron: temperatura de 60°C y relación molar octanol:ácido de 3,6. Es evidente que en ambos casos se logra maximizar el rendimiento de éster bajo un exceso de alcohol, el cual tiene la característica de ser graso; por lo tanto se pueden presentar dificultades al momento de separar el éster producido del medio de reacción en un proceso de mayor escala.

2.5 AJUSTE DE LOS PARAMETROS CINÉTICOS

Para todos los experimentos del diseño de superficie de respuesta se ajustaron los parámetros cinéticos con cada uno de los modelos propuestos y se calcularon los

criterios de selección mencionados anteriormente con el fin de comparar y determinar el mejor ajuste. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Coeficiente de determinación (R^2) y porcentaje de error medio absoluto (PEMA) para cada uno de los modelos evaluados.

Experimento	Modelo Ping Pong Bi Bi sin inhibición		Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por sustrato A		Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por sustrato B		Modelo Ping Pong Bi Bi con inhibición por ambos sustratos		Modelo complejo ternario		Modelo Ping Pong Bi Bi inhibición por producto Q	
	R^2	PEMA	R^2	PEMA	R^2	PEMA	R^2	PEMA	R^2	PEMA	R^2	PEMA
34°C - RM 3:1	0,656	15,7	0,669	15,0	0,659	15,3	0,671	14,6	0,722	14,0	0,998	1,2
40°C - RM 1:1	0,834	21,4	0,816	22,2	0,834	21,4	0,849	20,8	0,860	19,0	0,999	2,6
40°C - RM 5:1	0,707	13,6	0,730	12,8	0,729	12,6	0,739	12,3	0,730	12,5	0,999	0,4
55°C - RM 0,17:1	0,882	14,4	0,888	14,4	0,888	14,4	0,888	14,4	0,894	14,2	0,962	6,5
55°C - RM 3:1	0,828	71,6	0,813	68,1	0,837	61,4	0,797	70,9	0,879	53,6	0,975	20,2
55°C - RM 5,82:1	0,833	20,6	0,833	20,6	0,833	20,6	0,833	20,6	0,890	16,1	0,975	4,3
70°C - RM 1:1	0,789	34,7	0,794	34,6	0,792	35,2	0,807	32,2	0,767	33,1	0,986	6,8
70°C - RM 5:1	0,776	47,3	0,692	66,2	0,751	50,4	0,757	50,9	0,788	53,0	0,943	23,7
76°C - RM 3:1	0,706	50,3	0,693	51,7	0,691	51,5	0,707	50,6	0,770	44,5	0,898	30,1
Promedio	**0,779**	**32,2**	**0,770**	**33,9**	**0,779**	**31,4**	**0,783**	**31,9**	**0,811**	**28,9**	**0,971**	**10,6**

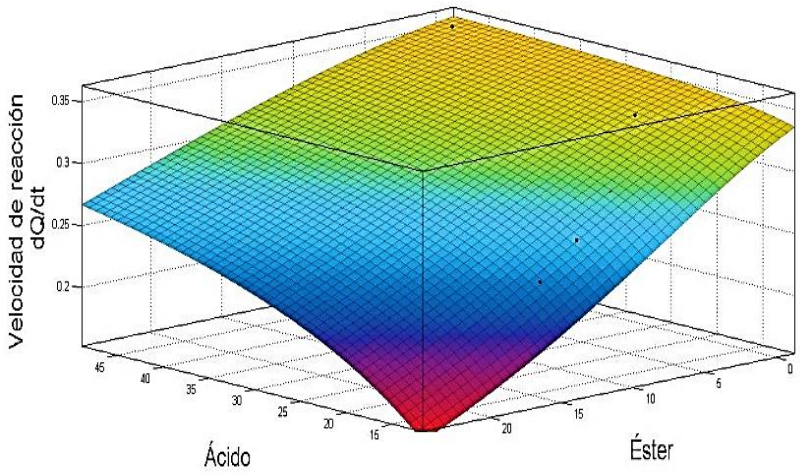
De acuerdo con la tabla anterior se evidencia que el modelo de inhibición por producto describe de forma adecuada la reacción de esterificación con un R^2 promedio de 0,971 y un valor PAME promedio de 10,6 en comparación con los demás modelos sugeridos por la literatura. Los parámetros ajustados para el modelo escogido se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros ajustados del modelo de inhibición por producto.

Temperatura (°C)	Relación molar (Dodecanol:ácido)	V_m (mM/h)	K_m (mM)	K_{i1} (mM^{-1})	K_{i2} (mM^{-2})
70	1	0,317	0,203	2,586	0,508
70	5	1,143	0,013	0,068	3,810
40	1	0,304	0,677	2,810	0,311
40	5	0,362	1,238	0,209	0,013
34	3	0,172	0,285	1,695	0,413
76	3	0,868	0,014	0,020	7,922
55	0,17	0,077	2,675	2,037	0,132
55	3	0,768	0,205	2,527	0,141
55	5,8	0,935	0,293	0,672	0,159

La figura 10 representa la superficie de ajuste del modelo de inhibición por producto. Dicha inhibición se puede presentar debido a que la reacción de esterificación es reversible y hay posibilidad de que algunas moléculas de producto se unan al sitio activo de la enzima y bloqueen el mecanismo de producción del mismo (Kriti *et al.,* 2013).

Figura 10. Superficie de ajuste del modelo de inhibición por éster a 40°C y relación molar dodecanol:ácido 5:1



2.5.1. Evaluación del modelo cinético. Se realizó un ajuste para cada parámetro a un modelo no lineal mediante el software CurveExpert Professional 2.3.0 (versión de prueba) con el fin de obtener una función que permita predecir su valor en todas las regiones de temperatura y relación molar estudiadas. (Las funciones de ajuste y el porcentaje de error de cada una se muestran en el Anexo D). Con el fin de evaluar el modelo escogido se calcularon los parámetros cinéticos en las condiciones óptimas de temperatura de 54 °C y relación molar dodecanol:ácido de 4:1 los cuales se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros del modelo cinético de inhibición por producto en condiciones óptimas.

Temperatura (°C)	Relación Molar (Dodecanol:ácido)	V_m (mM/h)	K_m (mM)	K_{i1} (mM^{-1})	K_{i2} (mM^{-2})
54	4	0,668	0,186	1,491	0,325

Para evaluar el modelo de inhibición por éster en las condiciones óptimas (ecuación 4) se integró obteniendo la ecuación 5. Conociendo los valores del ácido consumido en el tiempo y los parámetros cinéticos (K_m, K_{i1}, K_{i2}, V_m) en condiciones óptimas, se calculó el cambio de la concentración del éster en el tiempo y el rendimiento máximo alcanzada a 96 horas de reacción.

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\frac{[A]V_m}{[A]+K_m(1+K_{i1}[Q]+K_{i2}[Q]^2)}\right) \qquad (4)$$

$$[A][Q]+K_m\left([Q]+K_{i1}\frac{[Q]^2}{2}+K_{i2}\frac{[Q]^3}{3}\right)=[A]V_m t \qquad (5)$$

Se realizaron ajustes del ácido a cada tiempo (0, 8, 16, 24, 36, 48 y 96 horas) como función de temperatura y relación molar (Anexo E). A partir de las funciones de ajuste se obtuvieron los valores del cambio de la concentración del ácido en el tiempo y de la ecuación 5 los valores de la concentración del éster (tabla 8).

Tabla 8. Rendimiento del éster en condiciones óptimas de reacción.

Tiempo (horas)	Ácido (mM)	Éster (mM)	% Rendimiento Éster
0	47,24	0	0
8	26,60	16,97	35,93
16	18,57	19,21	40,67
24	16,54	21,38	45,25
36	15,66	24,29	51,42
48	14,92	26,49	56,07
96	14,17	33,31	70,52

La concentración máxima alcanzada a un tiempo de reacción de 96 horas calculada por la integración del modelo fue de 70,52% y la obtenida por el diseño de superficie de respuesta fue de 68,24%. Lo cual muestra que el error generado por el modelo fue 3,3% indicando que el modelo de inhibición por éster se ajusta adecuadamente a los datos experimentales en las condiciones óptimas de reacción.

3. CONCLUSIONES

- La reacción de esterificación catalizada con carga enzimática de 31% permitió obtener un rendimiento del 65% en un periodo de reacción de 96 horas, sin evidenciarse aumento significativo en el rendimiento al duplicar la carga del catalizador en un periodo igual de reacción. Al duplicar el tiempo de reacción no se generó cambios significativamente altos en el rendimiento del producto e implica gastos energéticos innecesarios.

- La máxima velocidad inicial de reacción fue obtenida a una agitación de 450 rpm, indicando que en este punto las limitaciones de transferencia de masa externas tienen menor efecto.

- La temperatura y la relación molar son variables que presentan gran influencia en la reacción de esterificación. Las condiciones óptimas de reacción obtenidas mediante el diseño experimental de superficie de respuesta fueron temperatura de 54°C y relación molar dodecanol:ácido de 4:1 para lograr un rendimiento teórico máximo de 68%.

- Se ajustó por primera vez el comportamiento cinético de la reacción de esterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico y dodecanol, a un modelo de inhibición por producto con un PEMA y R^2 promedio de 10,6 y 0,971 respectivamente. Este modelo fue evaluado para las condiciones óptimas con un error del 3,3%.

4. RECOMENDACIONES

- Se aconseja realizar el estudio cinético con otros alcoholes grasos con el fin de encontrar un modelo de ajuste general para esterificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico, e identificar la influencia de la longitud de la cadena alifática sobre las constantes cinéticas de afinidad e inhibición del modelo que presente el mejor ajuste.

- Se recomienda plantear una metodología para la recuperación y adecuación del catalizador y el tamiz molecular; e identificar la cantidad de veces que se pueden reutilizar con el fin de disminuir los costos en el proceso.

- Realizar mayor número de experimentos en la región de temperatura y relación molar para obtener tendencias competas del comportamiento de las constantes cinéticas con el fin de mejorar las ecuaciones de ajuste de los parámetros cinéticos y reducir el error generado por las funciones de ajuste.

- Plantear y optimizar un proceso de separación para el dihidrocafeato de dodecilo, con el fin de obtener un producto de alta pureza y asegurar la reutilización de solventes en el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVES DIEZ, Ángel Emilio y CASTAÑEDA SANDOVAL, Laura Margarita. Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. En: Vitae. Universida de Antioquia. 2012. Vol. 19, núm. 3,

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. Automatic Control. En: IEEE Transactions. 1974. Vol. 19 N° 6. Pag. 716-723.

AKOH, C. Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. En: Biotechnology letters. 1993. Vol. 15 n° 9. Pag 949-954.

ALBERTY, R. Estimation of kinetic parameters when modifiers are bound in enzyme-catalyzed reactions. En: The Journal of Physical Chemistry B. 2010. Vol. 114 N° 4. Pag 1684-1689.

BHANDARI, K. *et.al.* Kinetic study on enzymatic esterification of tuna fish oil fatty acids with butanol. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013. Vol. 94. pag 104-110.

BORNADEL, A., *et al.* Kinetic modeling of lipase-catalyzed esterification reaction between oleic acid and trimethylolpropane: A simplified model for multi-substrate multi-product ping–pong mechanisms. En: Biotechnology progress, 29 (6), 2013, pag 1422-1429.

BUISMAN, G., *et al.* Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. En: Biotechnology Letters 1998. Vol. 20 N° 2. Pag 131-136.

CLELAND, W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects, 67, 1963, pag 104-137.

DUAN, Z., DU, W., LIU, D. The pronounced effect of water activity on the positional selectivity of Novozym 435 during 1, 3-diolein synthesis by esterification. En: Catalysis Communications 2010. Vol. 11 N° 5. Pag 356-358.

DUAN, Z., DU, W., LIU, D. Novozym 435-catalyzed 1, 3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. En: Process Biochemistry 2010. Vol. 45 N° 12. Pag 1923-1927.

GARCÍA CUBIDES, Jose Luis. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUIL ÉSTERES DEL ÁCIDO 3-4 DIHIDROXIHIDROCINÁMICO POR EL MÉTODO ORAC LIPOFÍLICO Y EFECTO DE SU DOSIFICACIÓN EN ACEITE DE PALMA COMERCIAL, Tesis de grado Química, Universidad industrial de Santander, 2015.

GUNCHEVA, M., ZHIRYAKOVA, D. High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified Candida rugosa lipase. En: Biotechnology letters 2008. Vol. 30 N°3. Pag 509-512.

ITABAIANA, I., GONÇALVES, K., CORDEIRO, Y., ZOUMPANIOTI, M., LEAL, I., MIRANDA, L., XENAKIS, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2013. Vol. 96. Pag. 34-39.

KIM, S., *et al.* Anticholesterolemic effect of 3, 4-di (OH)-phenylpropionic amides in high-cholesterol fed rats. En: Toxicology and applied pharmacology 2005. Vol. 208 N°1. Pag 29-36.

KRAAI, G., WINKELMAN, J., DE VRIES, J., HEERES, H. Kinetic studies on the Rhizomucor miehei lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. En: Biochemical Engineering Journal 2008. Vol. 41 N°1. Pag 87-94.

KRISHNA, S. H., KARANTH, N. G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: a kinetic study. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 2001. Vol. 1547 N°2. Pag 262-267.

LESKOVAC, V. Comprehensive enzyme kinetics. En: Springer Science & Business Media 2003. Pag 415.

LOPEZ GIRALDO, L., *et al.* Lipophilisation de composés phénoliques par voie enzymatique et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées. En: Oléagineux, Corps gras, Lipides 2007. Vol. 14 N°1. Pag 51-59. (a)

LOPEZ GIRALDO, L., *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. En: Enzyme and Microbial Technology 2007. Vol. 41 N° 6. Pag 721-726. (b)

LOPRESTO, C., CALABRÒ, V., WOODLEY, J., TUFVESSON, P. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized Candida antarctica lipase B. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2014. Vol. 110. Pag 64-71.

MARTINELLE, M., HULT, K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by Candida antarctica lipase B. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 1995. Vol. 1251 N°2. Pag. 191-197.

POQUET, L., CLIFFORD, M., WILLIAMSON, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. En: Archives of biochemistry and biophysics 2008. Vol 476 N°2. Pag 196-204.

POQUET, L., CLIFFORD, M., WILLIAMSON, G. Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. En: Biochemical pharmacology 2008. Vol. 75 N° 5. Pag 1218-1229.

PRAZERES, D., LEMOS, F., GARCIA, F., CABRAL, J. Modeling lipolysis in a reversed micellar system: Part I. Conventional batch reactor. En: Biotechnology and bioengineering 1993. Vol. 42 N°6. Pag 759-764.

QUIÑONES, M., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. En: Nutrición Hospitalaria 2012. Vol. 27 N°1. Pag 76-89.

RAITA, M., KIATKITTIPONG, W., LAOSIRIPOJANA, N., CHAMPREDA, V. Kinetic study on esterification of palmitic acid catalyzed by glycine-based crosslinked protein coated microcrystalline lipase. En: Chemical Engineering Journal 2015. Vol. 278. Pag 19-23.

SABALLY, K., KARBOUNE, S., ST-LOUIS, R., KERMASHA, S. Lipase-catalyzed synthesis of phenolic lipids from fish liver oil and dihydrocaffeic acid. En: Biocatalysis and Biotransformation 2007. Vol. 25 N° 2-4. Pag 211-218.

SABALLY, K., KARBOUNE, S., YEBAOH, F., KERMASHA, S. Enzymatic esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media. En: Biocatalysis and Biotransformation 2005. Vol. 23 N°1. Pág. 37-44.

SABBANI, S., HEDENSTRÖM, E. Control of water activity in lipase catalysed esterification of chiral alkanoic acids. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2009. Vol. 58 N°1. Pag 6-9.

SORENSEN, A., NIELSEN, N., YANG, Z., XU, X., JACOBSEN, C. Lipophilization of dihydrocaffeic acid affects its antioxidative properties in fish-oil-enriched emulsions. En: European Journal of Lipid Science and Technology 2012. Vol. 114 N°2. Pag 134-145.

STERGIOU, P., *et al.* Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. En: Biotechnology advances 2013. Vol. 31 N°8. Pag 1846-1859.

SUN, J., JIANG, Y., ZHOU, L., GAO, J. Optimization and kinetic study of immobilized lipase-catalyzed synthesis of ethyl lactate. En: Biocatalysis and Biotransformation 2010. Vol. 28 N°4. Pag 279-287.

ULUSU, NURIYE NURAY. Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms. En: Journal of molecular evolution 2015. Vol. 80 N° 5-6. Pag 251-257.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. En: Biotechnology Advances 2007. Vol. 25 N°6. Pag 515-536.

VOSMANN, K., WEITKAMP, P., WEBER, N. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of long-chain alkyl phenylpropanoates and phenylpropyl alkanoates. En: Journal of agricultural and food chemistry 2006. Vol. 54 N°8. Pag 2969-2976.

WANG, Y., *et al.* A kinetic study of starch palmitate synthesis by immobilized lipase-catalyzed esterification in solvent free system. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2014. Vol. 101. Pag 73-79.

YANG, Z., *et al*. Improved enzymatic production of phenolated acylglycerols through alkyl phenolate intermediates. En: Biotechnology letters 2011. Vol. 33 N°4. Pag 673-679.

YANG, Z., GUO, Z., XU, X. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. En: Food Chemistry 2012. Vol. 132 N°3. Pag 1311-1315.

ZHANG, D., LI, C., ZHI, G. Kinetic and thermodynamic investigation of enzymatic l-ascorbyl acetate synthesis. En: Journal of biotechnology 2013. Vol 168 N°4. Pag 416-420.

ZHANG, D., JIN, C., LIU, L. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. En: Royal society of chemistry 2014. Vol 6 N°4. Pag 2879-2891.

ANEXOS

ANEXO A. CROMATOGRAMAS Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

La cuantificación del 1-Dodecanol se realizo por Cromatografia de gases (GC) como lo muestra la figura E1 a un tiempo de retencion de 10,8 minutos. La cuantificación del ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico y del dihidrocafeato de dodecilo (ÉSTER) se realizó por cromatografia liquida de alta eficciencia(HPLC) como lo muestra la figura E2 a un tiempo de retencion de 3,28 y 5,48 minutos respectivamente.

Figura A1. Cromatograma del 1-Dodecanol realizado por cromatografia de gases (GC).

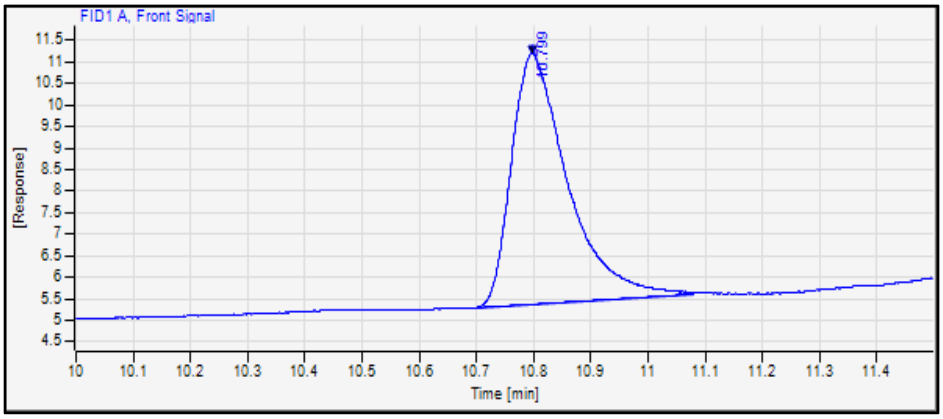
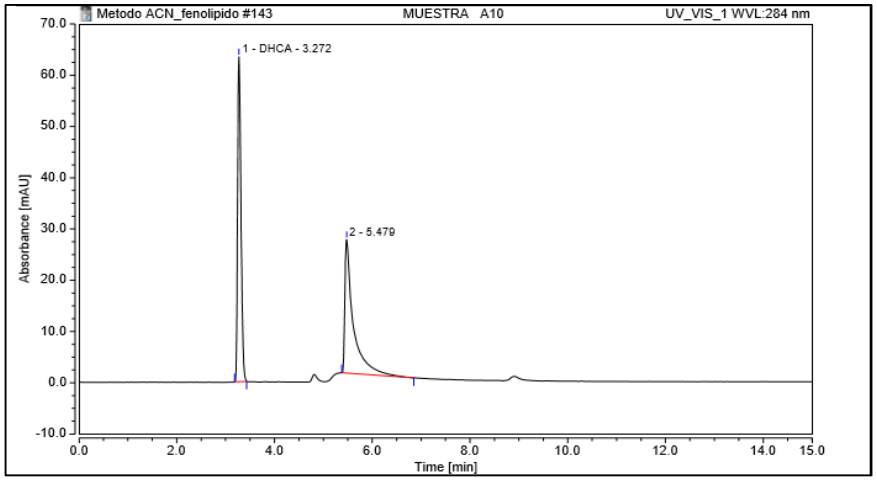


Figura A2. Cromatograma del 1-Dodecanol realizado por cromatografia líquida (HPLC).



CURVAS DE CALIBRACIÓN

Figura A3. Curva de calibración 1-Dodecanol.

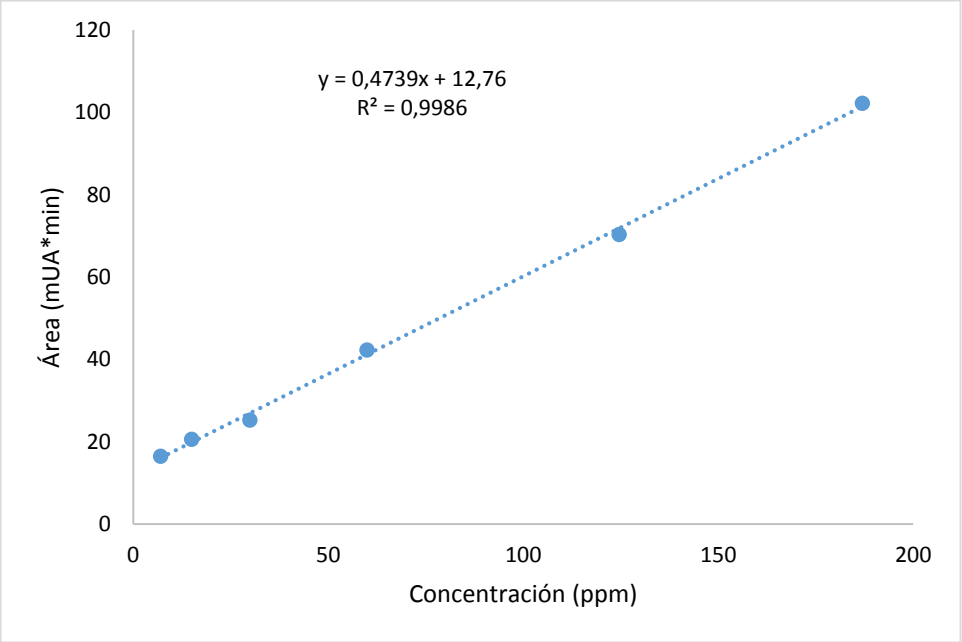


Figura A4. Curva de calibración Ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico

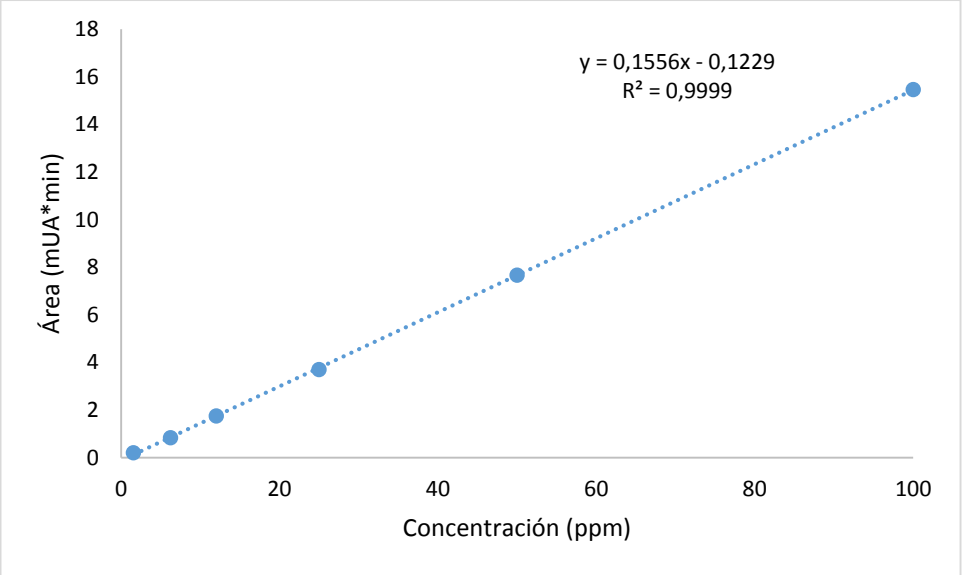
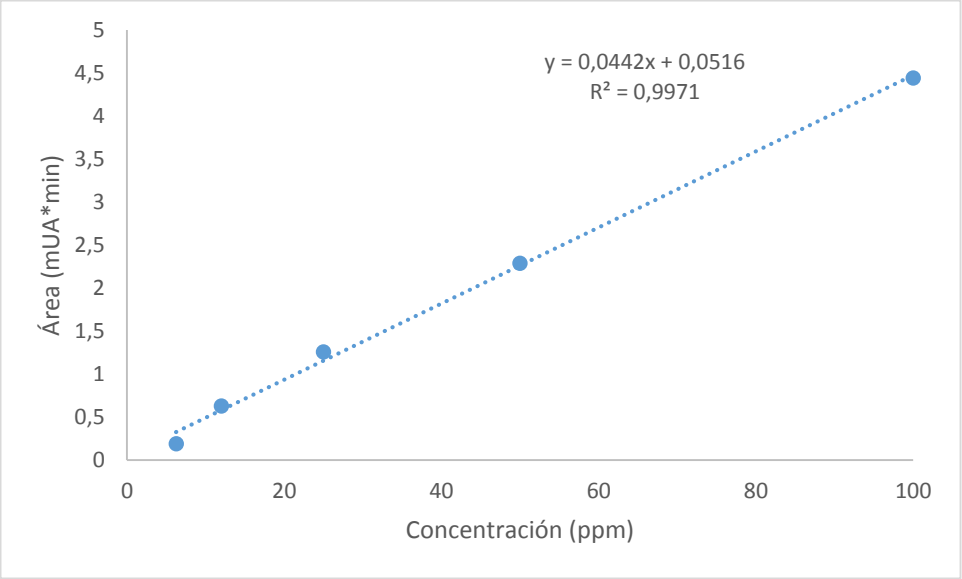


Figura A5. Curva de calibración dihidrocafeato de dodecilo (Éster)



ANEXO B. PESOS DE LA VARIABLE DEPENDIENTE Y DESCRIPTORES DE ERROR

El valor de peso para la variable dependiente está dado por:

$$W_i = \frac{1/\sigma_i^2}{\sum_{i=1}^{n} 1/\sigma_i^2}$$

La varianza de la variable dependiente en los datos experimentales está dada por:

$$\sigma_i = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_{i,EXP} - \mu_i)^2}{n-1}$$

El valor promedio de la variable dependiente en los datos experimentales está dado por:

$$\mu_i = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_{i,EXP}}{n}$$

Donde $y_{i,EXP}$ corresponde al valor experimental de cada variable y n el número de experimentos.

El coeficiente de determinación (R^2) y el valor del porcentaje de error medio absoluto (PEMA) se calcularon usando las siguientes expresiones:

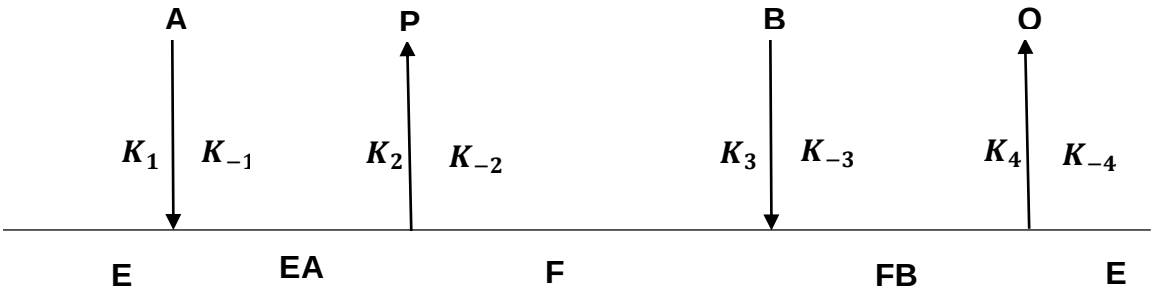
$$R^2 = \left[\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{y_{i,EXP} - \bar{y}_{EXP}}{y_{i,P} - \bar{y}_p}\right)\right]^2$$

$$PEMA = \frac{100\%}{n}\sum_{i=1}^{n}\left|\frac{y_{i,EXP} - y_{i,P}}{y_{i,EXP}}\right|$$

Donde $y_{i,EXP}$ es el valor experimental, $\bar{y}_{EXP}$ es el promedio de los valores experimentales, $y_{i,P}$ es el valor predicho, $\bar{y}_p$ es el promedio de los valores predichos y n el número de datos ajustados.

ANEXO C. DESARROLLO MATEMÁTICO DEL MODELO DE PING PONG BI BI SIN INHIBICIÓN

Diagrama del mecanismo cinético de Ping Pong Bi Bi sin inhibición propuesto por Cleland (1963). Donde A hace referencia al Ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico, B al Dodecanol, P al Agua, Q al éster formado; E, EA, F, y FB hacen referencia a la enzima y a los complejos enzimáticos respectivamente.



Las ecuaciones cinéticas que describen el modelo Ping Pong Bi-Bi sin inhibición son:

$$E+A \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\longleftrightarrow}} EA \quad (1)$$

$$EA \underset{K_{-2}}{\overset{K_2}{\longleftrightarrow}} F+P \quad (2)$$

$$F+B \underset{K_{-3}}{\overset{K_3}{\longleftrightarrow}} FB \quad (3)$$

$$FB \underset{K_{-4}}{\overset{K_4}{\longleftrightarrow}} E+Q \quad (4)$$

Donde las respectivas velocidades de reacción para los compuestos involucrados en la esterificación se presentan a continuación:

$$\frac{d[A]}{dt} = K_{-1}[EA] - K_1[E][A] \quad (5)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = K_2[EA] - K_{-2}[P][F] \quad (6)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = K_2[EA] - K_{-2}[P][F] - K_3[B][F] + K_{-3}[FB] \quad (7)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = K_{-3}[FB] - K_3[B][F] \quad (8)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = K_4[FB] - K_{-4}[Q][E] \quad (9)$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = K_1[E][A] - K_{-1}[EA] - K_2[EA] + K_{-2}[P][F] \quad (10)$$

$$\frac{d[FB]}{dt} = K_3[B][F] - K_{-3}[FB] - K_4[FB] + K_{-4}[Q][E] \quad (11)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = K_{-1}[EA] - K_1[E][A] + K_4[FB] - K_{-4}[Q][E] \quad (12)$$

Asumiendo hipótesis de estado estable para los intermedios de reacción en las ecuaciones (7), (10), (11).

$$0 = K_2[EA] - K_{-2}[P][F] - K_3[B][F] + K_{-3}[FB] \quad (13)$$

$$0 = K_1[E][A] - K_{-1}[EA] - K_2[EA] + K_{-2}[P][F] \quad (14)$$

$$0 = K_3[B][F] - K_{-3}[FB] - K_4[FB] + K_{-4}[Q][E] \quad (15)$$

Despejando de la ecuación (15) [FB] se obtiene:

$$[FB] = \frac{K_3[B][F] + K_{-4}[Q][E]}{(K_4 + K_{-3})} \quad (16)$$

Aplicando el mismo procedimiento para las ecuaciones (14)

$$[EA] = \frac{K_1[E][A] + K_{-2}[P][F]}{(K_2 + K_{-1})} \quad (17)$$

Tomando las ecuaciones (16) y (17) y reemplazándolas en la ecuación (13) se obtiene:

$$[F] = \left(\frac{([A]K_1K_2(K_{-3}+K_4) + [Q](K_{-1}+K_2)K_{-3}K_{-4})[E]}{[B](K_{-1}+K_2)K_3K_4 + [P]K_{-1}K_{-2}(K_{-3}+K_4)}\right) \quad (18)$$

Reemplazando (18) en las ecuaciones (16) y (17) se logra:

$$[EA] = \left(\frac{\left([A]\left([B]K_3K_4 + [P]K_{-2}(K_{-3}+K_4)\right)K_1 + [P][Q]K_{-2}K_{-3}K_{-4}\right)[E]}{[B](K_{-1}+K_2)K_3K_4 + [P]K_{-1}K_{-2}(K_{-3}+K_4)}\right) \quad (19)$$

$$[FB]=\left(\frac{([A][B]K_1K_2K_3+([B](K_{-1}+K_2)K_3+[P]K_{-1}K_{-2})[Q]K_{-4})[E]}{[B](K_{-1}+K_2)K_3K_4+[P]K_{-1}K_{-2}(K_{-3}+K_4)}\right) \quad (20)$$

Se expresa la enzima inicial en función de la enzima final y los complejos enzimáticos:

$$[E_o]=[E]+[EA]+[F]+[FB] \quad (21)$$

Reemplazando [EA], [F], [FB] en la ecuación anterior y despejando [E] se logra llegar a:

$$[E]=\left(\begin{array}{c}\frac{\left([B](K_{-1}+K_2)K_3K_4+[P]K_{-1}K_{-2}(K_{-3}+K_4)\right)[Eo]}{[A]\left(\begin{array}{c}[B](K_2+K_4)K_3+\\([P]K_{-2}+K_2)(K_{-3}+K_4)\end{array}\right)K_1+[B]([Q]K_{-4}+K_4)} \\ (K_{-1}+K_2)K_3+[P]\left(\begin{array}{c}[Q](K_{-1}+K_{-3})K_{-4}\\+K_{-1}(K_{-3}+K_4)\end{array}\right)K_{-2}+[Q](K_{-1}+K_2)K_{-3}K_{-4}\end{array}\right) \quad (22)$$

Reemplazando las expresiones de las concentraciones de los complejos enzima sustrato y de la enzima dentro de las velocidades de reacción para los productos de interés se llega a:

$$\frac{d[Q]}{dt}=K_4[FB]-K_{-4}[Q][E]$$

$$\frac{d[Q]}{dt}=\left(\begin{array}{c}\frac{([A][B]K_1K_2K_3K_4-[P][Q]K_{-1}K_{-2}K_{-3}K_{-4})[Eo]}{[A]\left(\begin{array}{c}[B](K_2+K_4)K_3+\\([P]K_{-2}+K_2)(K_{-3}+K_4)\end{array}\right)K_1+[B]([Q]K_{-4}+K_4)} \\ (K_{-1}+K_2)K_3+[P]\left(\begin{array}{c}[Q](K_{-1}+K_{-3})K_{-4}\\+K_{-1}(K_{-3}+K_4)\end{array}\right)K_{-2}+[Q](K_{-1}+K_2)K_{-3}K_{-4}\end{array}\right)$$

Reorganizando el denominador obtiene:

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\frac{([A][B]K_1K_2K_3K_4 - [P][Q]K_{-1}K_{-2}K_{-3}K_{-4})[Eo]}{\begin{array}{c}[A][B](K_2+K_4)K_3K_1 + [A][P]K_{-2}K_1(K_{-3}+K_4) + [A]K_2K_1(K_{-3}+K_4) + \\ [B][Q]K_3K_{-4}(K_{-1}+K_2) + [B]K_3K_4(K_{-1}+K_2) + [P][Q]K_{-2}K_{-4}(K_{-1}+K_{-3}) \\ + [P]K_{-1}K_{-2}(K_{-3}+K_4) + + [Q](K_{-1}+K_2)K_{-3}K_{-4}\end{array}} \right)$$

Relacionando todos los coeficientes de las ecuaciones cinéticas para transfórmalos en las contantes de Michaelis para la formación del producto de interés Q y asumiendo que las concentraciones iniciales de [P] y [Q] son cero, se llega a:

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\frac{[Eo][A][B]K_1K_2K_3K_4}{[A][B](K_2+K_4)K_3K_1 + [A]K_2K_1(K_{-3}+K_4) + [B]K_3K_4(K_{-1}+K_2)} \right)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\frac{[A][B]V1}{[A][B] + [A]K_{mB} + [B]K_{mA}} \right)$$

Finalmente, se obtiene los parámetros cinéticos del modelo:

$V1 = \frac{K_1K_2K_3K_4[Eo]}{(K_2+K_4)K_3K_1} = \frac{K_2K_4[Eo]}{(K_2+K_4)}$	Máxima velocidad de reacción de velocidad hacia delante
$K_{mB} = \frac{K_2K_1(K_{-3}+K_4)}{(K_2+K_4)K_3K_1} = \frac{K_2(K_{-3}+K_4)}{(K_2+K_4)K_3}$	Constante de Michaelis para el sustrato B
$K_{mA} = \frac{K_3K_4(K_{-1}+K_2)}{(K_2+K_4)K_3K_1} = \frac{K_4(K_{-1}+K_2)}{(K_2+K_4)K_1}$	Constante de Michaelis para el sustrato A

ANEXO D. ECUACIONES DE AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA Y RELACIÓN MOLAR

Los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de ajuste de inhibición por éster propuesto por Prazeres *et al*., (1993) para todos los puntos experimentales del diseño de superficie de respuesta fueron ajustados mediante regresión no lineal con el software CurveExpert Professional 2.3.0 (versión de prueba) el cual implementa el método de Levenberg-Marquardt. Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) para comparar los modelos y elegir el que presente menor pérdida de información y que no genere sobreajuste. A continuación, se presentan las funciones de ajuste para cada parámetro.

Función de Ajuste del parámetro cinético V_m:

$$V_m = A * (Temperatura)^B * (Relación\ Molar)^C$$

Constantes de ajuste	
A	0,000615729
B	1,518335
C	0,673072

Coeficiente de Determinación R^2	0,92
Criterio de información de Akaike	-34,6

Función de Ajuste del parámetro cinético K_m:

$$k_m = A * (Temperatura)^B * (Relación\ Molar)^C$$

Constantes de Ajuste	
A	157,646987
B	-1,396189
C	-0,843744

Coeficiente de Determinación R^2	0,80
Criterio de información de Akaike	-12,2

Función de Ajuste del parámetro cinético K_{i1}:

$$k_{i1} = A + B * Temp + C * RM + D * Temp^2 + E * RM^2 + F * Temp^3 + G * RM^3$$

Constantes de ajuste	
A	15,974394
B	-1,017463
C	2,42528
D	0,022423
E	-1,033026
F	-0,000156
G	0,101026

Coeficiente de Determinación R^2	0,98
Criterio de información de Akaike	20,1

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Función de Ajuste del parámetro cinético K_{i2}:

$$k_{i2} = A * ((B * Tem + C)^2 + (D * RM + E)^2)$$

Constantes de ajuste	
A	0,687856
B	1,01E-01
C	-4,756188
D	0,000006
E	-0,000024

Coeficiente de Determinación R^2	0,73
Criterio de información de Akaike	22,8

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

ANEXO E. ECUACIONES DE AJUSTE DEL ÁCIDO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA Y RELACIÓN MOLAR

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 0 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = (A + B * e^{Temp} + C * e^{RM})$$

Constantes de ajuste	
A	47,167
B	-1,27E-34
C	0,001352

Coeficiente de Determinación R^2	0,34
Criterio de información de Akaike	-21,3659

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 8 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(A + (Temp^B) + (RM^C)\right)$$

Constantes de ajuste	
A	19,984852
B	0,440612
C	-1,553414

Coeficiente de Determinación R^2	0,92
Criterio de información de Akaike	11,33

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 16 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(\frac{1}{A + B * LN(Temp) + C * LN(RM)}\right)$$

Constantes de ajuste	
A	0,00142095
B	0,01034072
C	0,008072

Coeficiente de Determinación R^2	0,92
Criterio de información de Akaike	12,88

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 24 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(\frac{1}{A + B * LN(Temp) + C * LN(RM)}\right)$$

Constantes de ajuste	
A	-0,01192391
B	0,0152749
C	0,00826667

Coeficiente de Determinación R^2	0,92
Criterio de información de Akaike	9,34

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 36 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(A * (Temp^B) * (RM^C)\right)$$

Constantes de ajuste	
A	46,632324
B	-2,30E-01
C	-0,126421

Coeficiente de Determinación R^2	0,86
Criterio de información de Akaike	7,13

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 48 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(\frac{1}{A + B * LN(Temp) + C * LN(RM)}\right)$$

Constantes de ajuste	
A	0,024089
B	0,008394
C	0,006807

Coeficiente de Determinación R^2	0,80
Criterio de información de Akaike	8,08

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.

Ecuación de ajuste de la concentración del ácido a 96 horas en función de la temperatura y relación molar.

$$Ácido = \left(\frac{1}{A + B * LN(Temp) + C * LN(RM)}\right)$$

Constantes de ajuste	
A	0,049117
B	0,002751
C	0,007564

Coeficiente de Determinación R^2	0,77
Criterio de información de Akaike	9,68

Donde Temp es la temperatura y RM la relación molar.