

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN S PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

**HIDROLISIS ENZIMATICA
DE ESTERES DE LUTEINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
AVILA FIGUEROA DIANA



MEXICO D. F.

279644

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Prof. Eduardo Barzana García.
Vocal	Prof. Raul Aguilar Caballero
Secretario	Amelia Ma. De Gpe. Farres Gonzalez Sarav
1er. Suplente	Arturo Navarro Ocaña
2do. Suplente	Javier Plasencia de la Parra

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química U.N.A.M.

Laboratorio 314 conjunto " E ".

Asesor del Tema:

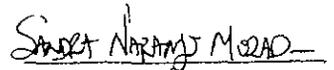
Dr. Eduardo Barzana García



E. Barzana

Supervisor Técnico

M. en C. Sandra Naranjo Modad



Sandra Naranjo Modad

Sustentante

Diana Avila Figueroa



Diana Avila Figueroa

A mis padres

Por haberme dado la oportunidad de ser mejor cada día. Gracias por ser los mejores maestros que he tenido.

A mis hermanos. Ismael, Alfonso y Ricardo.

Por haberme dado su cariño y comprensión y ser un ejemplo a seguir los amo mucho. Gracias.

A Gerardo

Por creer en mi y enseñarme que en la vida todavía hay muchos caminos que recorrer. Así como vivir cada día como si fuera el último de tu vida. Te amo.

A mis amigos

Por el hecho de serlo

A todas aquellas personas que en alguna u otra forma fueron una pieza importante en la realización de este trabajo.

A todos ustedes ¡GRACIAS!

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido completar mi educación profesional.

Agradezco a la Facultad de Química de la UNAM a través del (programa 121) y al Conacyt (proyecto 25189B) por su financiamiento otorgado para la realización de este proyecto. Así como ser la fuente de saber de la cual he podido disponer siempre para adquirir los conocimientos que han hecho de mi una mejor persona.

A el Doctor Eduardo Barzana García y la Doctora Sandra Narajo Modad por todo el apoyo, asesoría y paciencia que me proporcionaron durante la realización de este trabajo.

INDICE

CAPITULO I

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3

CAPITULO II

OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo General.....	7
2.2 Objetivos Particulares	7

CAPITULO III

ANTECEDENTES	8
3.1. Carotenos.....	8
3.1.1 Características generales de los carotenoides.....	8
3.1.2 Propiedades relevantes de los carotenos.....	14
3.1.3 Características generales de la luteína.....	16
3.1.4 Propiedades relevantes de la luteína.....	18
3.1.5 Importancia y producción de carotenoides.....	21
3.2. Aspectos generales de la flor de Cempasúchil.....	25
3.3 Generalidades sobre lípidos.....	26
3.3.1 Hidrólisis.....	28
3.3.2 Esterificación.....	29

3.3.3 Interesterificación.....	30
3.4 Generalidades sobre biocatálisis en medios no convencionales..	32
3.4.1 Factores determinantes de la actividad enzimática en medios no convencionales.....	33
3.4.1.1 Agua.....	33
3.4.1.2 pH y temperatura.....	35
3.4.1.3 Inmovilización enzimática.....	35
3.4.1.4 Solventes.....	37

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS.....	39
4.1 Materiales.....	39
4.1.1 Sustrato.....	39
4.1.2 Enzima.....	39
4.1.3 Soporte.....	40
4.1.4 Solventes y otros.....	41
4.2 Equipo.....	41
4.3 Métodos.....	42
4.3.1 Espectroscopia.....	42

4.3.2 Cromatografía en capa fina.....	44
4.3.2.1 Purificación de estándares.....	44
4.3.2.2 Cromatografía cualitativa.....	47
4.3.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	47
4.3.4 Preparación del biocatalizador.....	48
4.3.4.1 Lavado del soporte.....	49
4.3.4.2 Inmovilización de la lipasa de <i>Candida cylindracea</i>	49
4.3.5 Hidrólisis en fase acuosa.....	50
4.3.5.1 Efecto de la albúmina sobre el sustrato.....	51
4.3.6 Hidrólisis en fase orgánica.....	51

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
5.1 Reacción enzimática en fase acuosa.....	52
5.2 Reacción enzimática en fase orgánica.....	56
5.3 Estudios de degradación del colorante.....	62

CAPITULO VI

6.1 Conclusiones.....	66
6.2 Recomendaciones para mejorar las condiciones de reacción.....	67
6.3 Bibliografía.....	68

RESUMEN

Los carotenoides cuentan con una alta aceptación como colorantes en la industria alimentaria. Entre éstos se encuentra la luteína que se emplea ampliamente en la industria avícola. En México, la flor de Cempasúchil es una fuente importante de ésteres de luteína que deben ser hidrolizados para llegar al producto final. Industrialmente esta operación se lleva a cabo mediante extracción con solventes orgánicos seguido de una saponificación alcalina, la cual genera jabones, como subproductos sin ningún valor.

El objetivo principal de este trabajo fue obtener productos de hidrólisis en hexano (principalmente luteína), con el propósito de poder realizar en un futuro proyecto, la extracción del colorante y la hidrólisis en un solo paso.

En el presente trabajo se demuestra que una lipasa de *Candida cylindracea* tiene una afinidad sobre el diéster de luteína en medio acuoso en un sistema inmovilizado. La reacción se condujo a 37 ° C y fue monitoreada por TLC y HPLC. En un tiempo de 0.75 hr comienza la producción de luteína libre con un 2% alcanzando su máxima producción a las 72hr con un 28% de rendimiento.

Previo a la reacción en fase orgánica se requirió una hidratación del biocatalizador a un A_w de 0.97, con la finalidad de proporcionar un microambiente adecuado a la enzima inmovilizada y el agua necesaria para la hidrólisis. La reacción se llevó a cabo a 37°C , y se encontró que la producción de luteína comienza a las 24 hr, con una conversión de un 2.6% a las 144 hr.

Una de las posibles causas por la cual la producción de luteína fue baja en fase orgánica es que la enzima podría desnaturalizarse al estar en contacto tanto tiempo con el solvente. También se pudo deber a que la relación enzima:sustrato pudo no ser la óptima.

Debido a que los carotenoides son susceptibles a la degradación por diversos factores, y uno de los más importantes es el oxígeno, se estudió el efecto de este oxidante. Se encontró que tiene un efecto marcado en la degradación del sustrato, ya que a 40°C se pierde un 87.99% de color a las 24 hr, mientras que sin oxígeno se pierde sólo el 43.63%. Por su parte, la albúmina, presenta un efecto de estabilización de color ya que logra disminuir un 20% la degradación con respecto al control.

INTRODUCCION

Vivimos en un mundo lleno de color, en los paisajes, las plantas, los animales, en nosotros mismos. El color representa una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales y culturales. Las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular las asocia con las cosas que le rodean. Esto es importante en el área alimentaria, y se aplican como aditivos. La relación entre el color y el sabor es inseparable para que el consumidor adquiera un producto, pues con tan sólo verlo lo sustituirá por otro si no cumple con las "normas de calidad" del consumidor.

Los colores pueden ser sintéticos o naturales y son estos últimos los de mayor demanda en el mercado (1), pues en su mayoría no requieren de una certificación ni por la FDA ni la comunidad europea, ya que son productos no tóxicos, con lo cual se facilita su comercialización (2).

La flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) que es de origen mexicano, ha tenido una gran importancia cultural ya que la utilizaban los aztecas para cultos religiosos, debido a sus propiedades ornamentales y farmacéuticas. Hoy en día se utiliza en muchos estados de la República en la celebración del día de muertos. También es de gran importancia debido a su alto contenido de pigmentos.

Investigaciones recientes postulan que la ingesta de luteína puede prevenir enfermedades como la degradación macular (enfermedad relacionada con la pérdida de la vista) y algunos tipos de cáncer (3). La aplicación principal de los pigmentos derivados de la flor se da en la alimentación avícola para propiciar la pigmentación de la yema de huevo, así como de la piel y la carne. En la actualidad esta aplicación es la que confiere importancia económica a *T. erecta*. (4,5). El colorante debe ser hidrolizado para obtener luteína en su forma libre (no esterificada), ya que se ha demostrado que su asimilación es del orden del 15% mayor en las aves y por lo tanto tiene un mayor poder de pigmentación, que en su forma esterificada (6).

En el método tradicional de extracción del colorante (Fig. 1), una de las etapas más importantes es la hidrólisis del colorante (Fig. 2), la cual se realiza químicamente mediante una saponificación.

La finalidad de esta investigación fue realizar la hidrólisis enzimática de los pigmentos de la flor con una lipasa inmovilizada de *Cándida rugosa*, en el medio orgánico con el cual se extraen los colorantes en sistemas industriales. Este proceso presentaría la ventaja con respecto al método tradicional de hacer más eficiente el proceso de extracción del colorante, al extraer e hidrolizar en un solo paso.

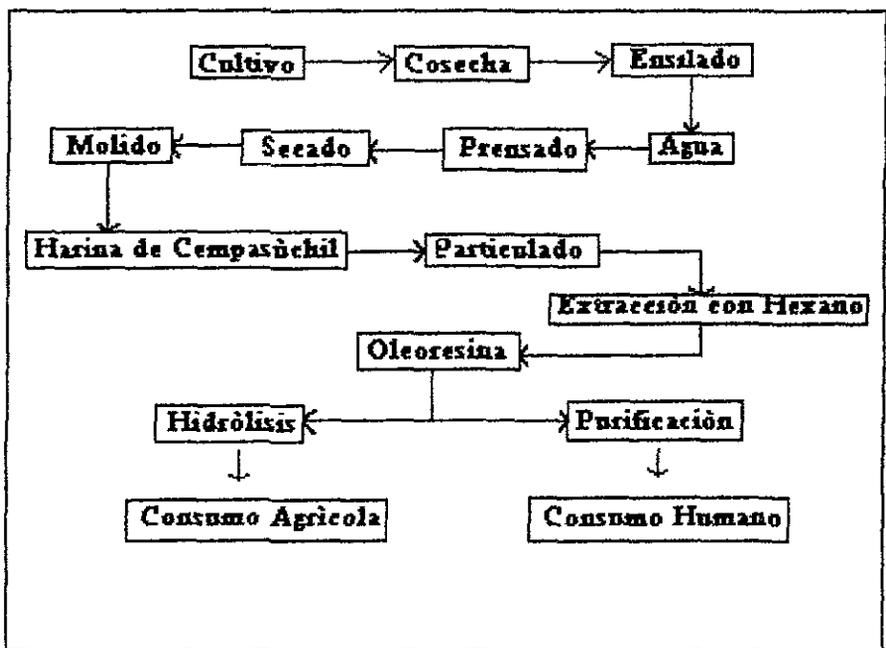


Fig 1. Proceso de extracción de carotenos a partir de la flor de Cempasúchil (2).

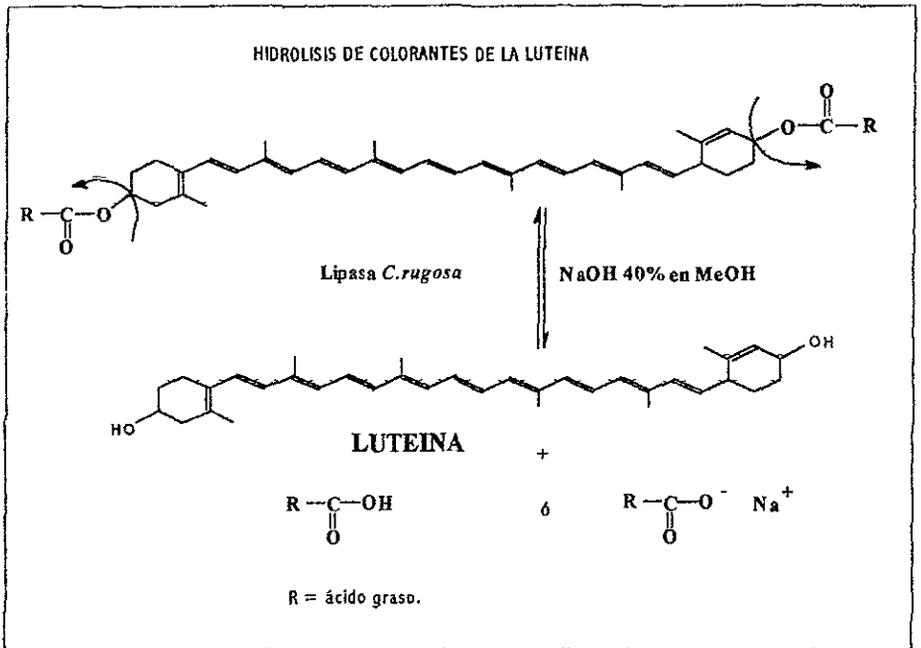


Fig 2. Proceso de saponificación industrial.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

- Establecer si la lipasa de *Cándida cylindracea* (EC 3.1.1.3) tiene la capacidad de hidrolizar pigmentos de la flor de Cempasúchil en medios ricos en hexano

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener productos de hidrólisis de pigmentos de la flor de Cempasúchil (principalmente luteína) vía enzimática en fase acuosa y orgánica (hexano).
- Conocer el perfil de los productos resultantes, mediante técnicas analíticas como espectroscopia uv/visible, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

ANTECEDENTES

3.1 CAROTENOS

3.1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides se aislaron por primera vez de la zanahoria en 1831. Son un grupo de pigmentos que varían del color rojo al amarillo, distribuidos a lo largo del reino vegetal y en algunos microorganismos. Los animales no pueden sintetizarlos por lo que tienen que ser administrados en su alimentación.

Existen más de 563 carotenoides de estructura conocida siendo los más comunes en la naturaleza los siguientes: fucoxantina, luteína, violaxantina, neoxantina, α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, licopeno, capsantina, bixina y criptoxantina (7). Tienen la capacidad de absorber energía en la región visible, y por consecuencia se comportan como grupo cromóforo.

La mayoría de los carotenoides tienen un esqueleto de 40 carbonos, formado por 8 moléculas de isopreno (ver fig 3).

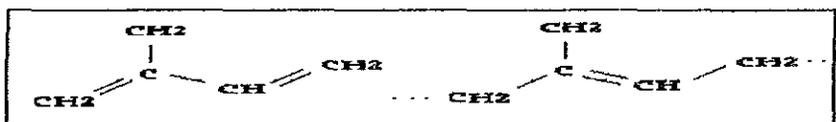


Fig 3 Estructura básica del caroteno (moléculas de isoprenos)

Según su estructura química los carotenoides se clasifican en (ver fig. 4):

Hidrocarburos:	Ej. Alfa, beta y gama caroteno, licopeno.
Alcoholes:	Ej. Criptoxantina, luteína, zeaxantina, flavoxantina, taraxantina, fucoxantina
Acidos:	Ej. Bixina, crocentina, azafraína.
Cetonas:	Ej. Capsantina, rodoxantina, capsorubina.

Al trabajar con carotenoides es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones para evitar su degradación.

- Temperatura: Altas temperaturas fragmentan la molécula en los puntos de unión de los anillos de ionona, teniendo como consecuencia pérdida de color.
- Los metales de transición (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+} , Cu^{+2} , Mn , Ni , Co) son buenos promotores de las reacciones de radicales libres, acelerando la oxidación, ya que transfieren electrones durante los cambios en las etapas de oxidación(3).
- Agentes quelantes: el EDTA es un secuestrante de los metales que inducen la oxidación y se utiliza para evitar degradación de los colorantes.
- Agentes antioxidantes: la mayoría de los antioxidantes estabilizan los carotenoides, ejemplo BHA, BTH, y BHQ.

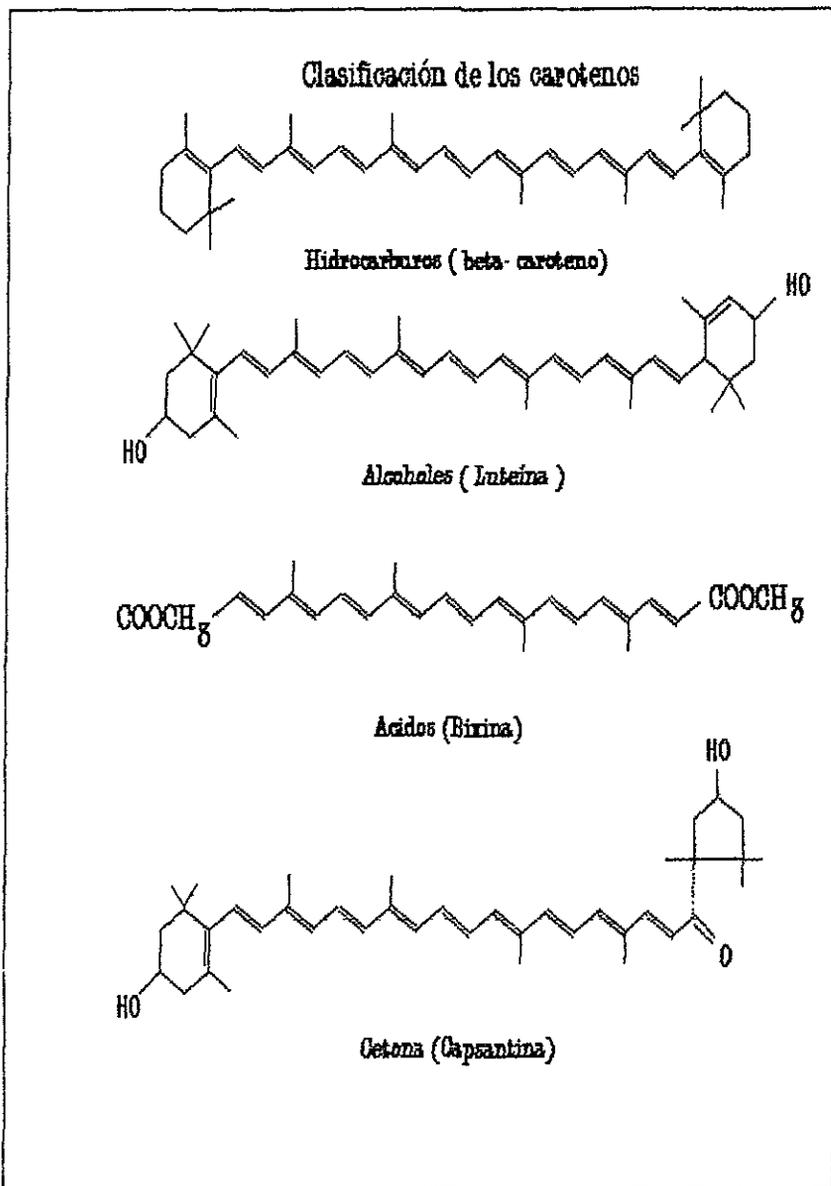


Fig 4. Clasificación de los carotenoides, en base a su estructura Química.

- Oxígeno: promotor de reacciones de pérdida de color.
- Luz y ácidos: promueven la isomerización de carotenoides *trans* a su configuración *cis*, teniendo como consecuencia una pérdida de color y actividad biológica, ya que la forma *trans* es la más estable, y más activa biológicamente. (3)
- Los productos iniciales de degradación por luz, calor y oxígeno son los epoxicarotenoides y apoxicarotenoides, los cuales son fácilmente formados durante la extracción, aislamiento y otras etapas de análisis. Su presencia en un alimento debe ser cuidadosamente controlada ya que puede proporcionar sabores desagradables al alimento (3).
- Para evitar la formación de estos productos, es necesario almacenar los carotenoides en atmósferas inertes, fuera de la exposición a la luz, y a bajas temperaturas.
- La naturaleza del medio juega un rol importante en la estabilización del colorante. Se sabe que en medios anhidros la cinética de degradación del colorante es de orden cero, y en medios acuosos sigue una cinética de orden uno. Por su parte, luz, temperatura y oxígeno aceleran la reacción de degradación independientemente del medio de reacción presente (8).

Los métodos clásicos para el análisis de los carotenoides, incluyendo las xantófilas, involucran la extracción con solventes, saponificación, separación cromatográfica, y cuantificación espectrofotométrica. En esta última técnica hay que tomar en cuenta la longitud de onda máxima de absorción en la región del visible, la cual varía dependiendo del tipo de solvente. El espectro visible que incluye varios máximos de absorción es característico para cada carotenoide (9).

La saponificación se realiza con 5-10% de una solución de hidróxido de potasio en metanol por períodos de tiempo de entre 20 min a 16 hr, en un rango de temperaturas de 25-60 °C, y tiene como objetivo remover triglicéridos y clorofilas (9).

En cuanto a la determinación de carotenoides es muy común el uso de cromatografías en capa fina y cromatografía de líquidos (HPLC), siendo este último el mejor método de análisis (10,7), por su alta resolución y la rapidez con la que minimiza la formación de productos de degradación.

La disponibilidad de formas puras de estos pigmentos a nivel industrial ha estado limitada, por lo que su uso se ha restringido principalmente a preparaciones farmacológicas, refiriéndose principalmente a su actividad como provitamina A (11).

Sin embargo, la producción industrial de estos pigmentos ha encontrado una vía de síntesis orgánica rentable y un mercado ávido del consumo de colorantes y antioxidantes. Debido a esto, el uso de los carotenoides en el área de alimentos se ha incrementado (2,7).

3.1.2 PROPIEDADES RELEVANTES DE LOS CAROTENOS

Las siguiente tabla resume las propiedades biológicas de los carotenoides en los alimentos (3,12).

Tabla I

Funciones
Algunos carotenoides tienen actividad de provitamina A
Acciones.
Antioxidante
Aumenta la respuesta inmune
Quizá aumenta la fertilidad
Inhibe la mutagénesis
Inhibe la transformación de las células <i>in vitro</i>
Inhibe el desarrollo de tumores en vivo
Asociaciones.
La ingesta de alimentos con alto contenido de carotenoides está asociado a una disminución en el riesgo de contraer cáncer de pulmón y otros tipos de cánceres

En la figura (5) se resumen las propiedades fisicoquímicas de los carotenoides (9).

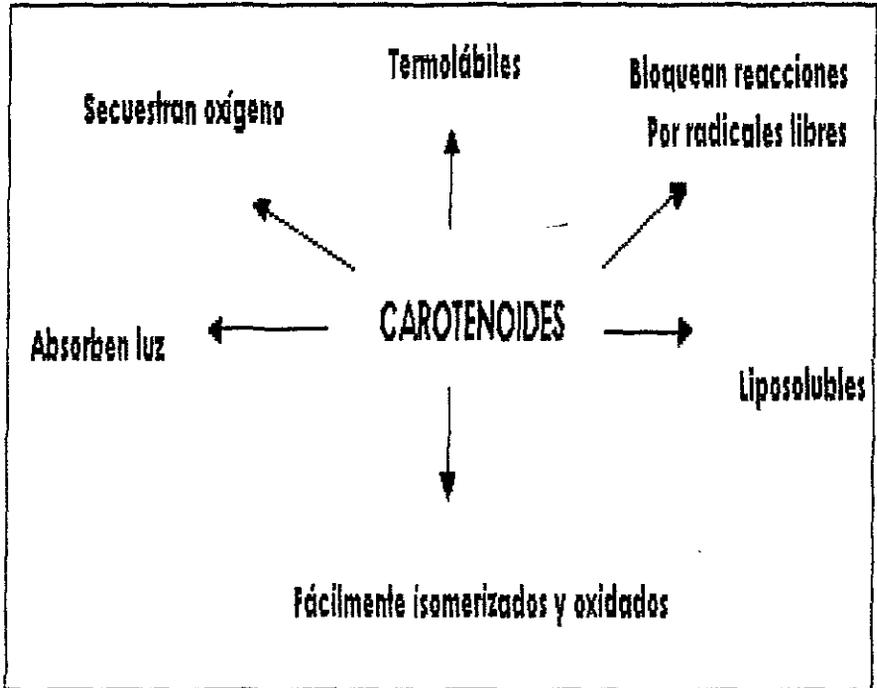


Fig 5. Características fisicoquímicas de los carotenoides.

3.1.3. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LUTEINA

La luteína es una xantofila que se encuentra en la naturaleza en frutas y vegetales asociada a proteínas, clorofilas, ó ácidos grasos (4).

Su fuente principal de obtención industrial es la flor de Cempasúchil, comercialmente cultivada en Centroamérica y la India, cuyos pétalos secos tienen altas concentraciones de luteína esterificada (aproximadamente el 60% del total de sus pigmentos)(13). Por encontrarse la luteína acilada con diferentes ácidos grasos, la solubilidad en grasas es alta. Los ácidos grasos con los que se encuentra esterificada son: laúrico, mirístico, palmitico y esterárico (13).

La mejor separación de los diésteres de luteína, en la flor de cempasúchil es por HPLC fase reversa (octadecilsina), usando sudan I como estándar interno. Con ello es posible separar los diésteres de luteína (dimiristato de luteína, miristato-palmitato de luteína, dipalmitato de luteína y estereato-palmitato de luteína).

La separación en fase normal (silica gel), tiene la desventaja de inducir la formación de isómeros cis de los carotenoides. La separación en fase reversa se fundamenta en el número de acilcarbonos de los ácidos grasos, por lo que es un método conveniente para proporcionar datos cuantitativos de los diferentes ácidos grasos esterificados individuales.

Una de las propiedades que se deben de tomar en cuenta en el análisis de los carotenoides, es su espectro máximo de absorción, el cual es característico para cada carotenoide. En la tabla II se muestran los máximos de absorción de la luteína en diferentes solventes (13). Junto con otras propiedades fisicoquímicas.

TABLA II. Propiedades fisicoquímicas de la luteína en solventes orgánicos (29)

Solvente	Solubilidad Mg / L.	Máx nm	Absortividad	Absortividad Molar.
Acetona	800	446	2540	144500
Acetonitrilo	100	446	2559	145600
Benzeno	600	456(458)	2350	133700(127200)
Cloroformo	6000	454(458)	2369	134800
Ciclohexano	50	448	2520	143400
Ciclohexanon diclorometano	4000	454	2359	134200
	800	452	2320	132000
DMF	1000	454	2390	136000
DMSO	1000	460	2369	134800
Etanol	300	444 (445)	2550	145100
Etilacetato	800	446	2529	143900
Etileter	2000	444	2629	149600
Hexano	20	444 (445)	2589	147300
2-propanol	400	444	2599	147900
Metanol	200	442(444)	2629	149600
MTBE	2000	444	2589	147300
THF	8000	450	2469	140500

3.1.4 PROPIEDADES RELEVANTES DE LA LUTEINA

Al ser carotenoide tiene propiedades de actuar como antioxidante. La luteína participa en el atrapamiento de peróxidos, protegiendo así a las células de un daño oxidativo(3).

El principal uso de la luteína y sus derivados es como colorante en la pigmentación animal, pero se ha encontrado que tiene una importancia en el consumo humano (ver tabla III). Forma parte de los 50 carotenoides que pueden ser metabolizados y absorbidos por el hombre, a pesar de no tener una actividad de provitamina A, como el α -caroteno y el β -caroteno(12). Se ha encontrado que una ingesta diaria de luteína de 6 mg por día es suficiente para prevenir enfermedades como la degradación macular (enfermedad relacionada con la pérdida de la vista en personas de edad avanzada), ya que la luteína y la zeaxantina son los únicos antioxidantes que son depositados específicamente en la región macular del ojo. Su función es de fotonutriente, ya que absorbe la luz ultravioleta, y evitan así una peroxidación de los lípidos que resulte en productos tóxicos para la retina (5).

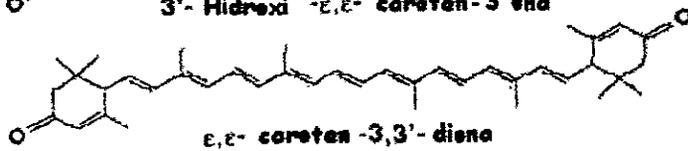
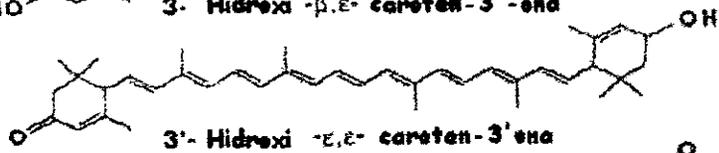
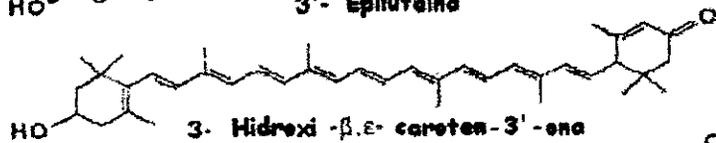
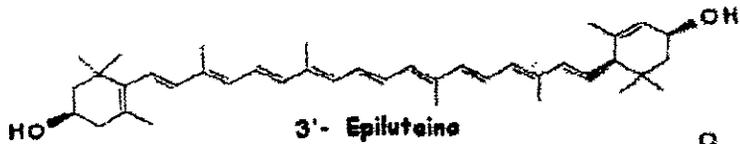
En general, durante las reacciones metabólicas de los carotenoides que no tienen una actividad de provitamina A, el esqueleto de la cadena poliénica permanece intacto. La transformación química se da en los grupos funcionales al final de la cadena los cuales, como en el caso de la luteína, puede sufrir reacciones de oxidación, reducción, deshidratación, ó migración de una doble ligadura (ver fig. 6) , formándose productos como la oxoluteína , entre otros .

TABLA III. Concentración de luteína , alfa y beta caroteno en vegetales.
(microgramos / 100 gramos) (5).

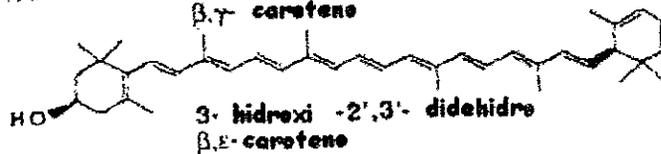
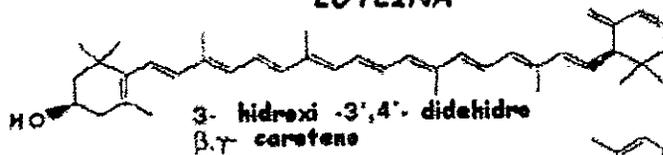
FRUTAS Y VEGETALES	LUTEINA	β-CAROTENO
Brocoli	1,900	700
Col de bruselas	1,300	480
Zanahoria	260	7,900
Chicharos	740	44
Col rizada	21,900	4,600
Lechuga	1,800	1,200
Maíz	780	51
Tomates	100	520
Espinaca	10,200	4,100

** Otras fuentes de luteína son: amaranto lechuga, berros, remolacha, camote

FUENTE
LUTEINA Y/O ZEAXANTINA



LUTEINA



LICOPENO

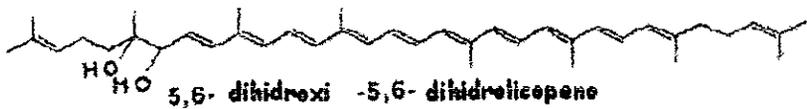


Fig.6 Metabolitos de carotenoides encontrados en el suero humano (12).

3.1.5 IMPORTANCIA Y PRODUCCION DE CAROTENOIDES

Este grupo de compuestos tiene propiedades deseables para su comercialización: nula toxicidad, alta versatilidad y alta actividad biológica. La actividad no solamente se refiere a que tienen una actividad de provitamina A, sino a que han demostrado prevenir úlceras, procesos degenerativos y cáncer (9,12). Algunos de éstos beneficios se deben a su propiedad de actuar como antioxidantes.

México es un país productor-exportador de diversas mezclas de carotenoides e importador de compuestos sintéticos idénticos a los naturales.

Las 4 principales empresas productoras de colorantes naturales en México son: Bioquimex , Industrias Alcosa , Industria Orgánica ,Mexicana de Extracción y Deshidratamex (2).

De los carotenos comerciales, el beta caroteno es uno de los más importantes en el área de alimentos y en medicamentos pues es reconocido que presenta la máxima actividad de provitamina A entre los carotenoides, además de que su precio es relativamente accesible comparado con otros (7).

Uno de los problemas más sobresalientes que enfrentan las empresas productoras de carotenoides naturales es el suministro de materias primas de calidad uniforme. La mayoría depende de la disponibilidad de diversos sectores agrícolas, que en muchas ocasiones usan sus cosechas para otros fines, lo que hace inseguro el suministro de materiales. Estas materias primas son producidas en gran parte del territorio nacional y son susceptibles de variaciones en precio y en calidad debido a factores ambientales.

La biotecnología en el campo de la producción de colorantes naturales ha incidido en forma importante en los últimos años, especialmente en aquéllos destinados a los alimentos debido al interés de los consumidores y de las instituciones normativas por utilizar cada vez una mayor cantidad de productos naturales.

La obtención de carotenoides por vías biotecnológicas se ha centrado en tres estrategias:

- Fermentación
- Utilización de enzimas.
- Cultivo de tejidos.

Con respecto a los colorantes obtenidos por vía fermentativa los principales son el β -caroteno y la monascina.

Los carotenoides existen en algunas especies bacterianas, principalmente las fotosintéticas y se ha pensado que estas especies podrían ser una adecuada fuente. Algunos hongos como las cepas mutantes de *Flavobacterium*, y ciertas algas verdiazules son productoras de zeaxantina. Algunas levaduras han sido reportadas como productoras de β -caroteno, como *Rhodotorula flava*, *Rhodotorula gracilis* y *Rhodotorula sarnieli*. Dentro de los microorganismos productores de xantofilas los que han sido estudiados extensivamente son los de la familia *Dacrymycetaceae* (por ejemplo, *Dacrymyces deliquensces*) (2).

Una de las alternativas para aumentar el rendimiento de extracción de colorantes, es la adición de enzimas (generalmente pectinasas y celulasas). Al actuar las enzimas sobre componentes de la pared celular se ve favorecida la liberación de los compuestos coloridos atrapados en el tejido vegetal (14).

Otro caso es el uso de lipasas propuesto para la extracción de carotenos a partir de paprika. También se han hidrolizado diésteres de xantofilas por medio de una lipasa de *Candida cylindracea*, con el fin de obtener xantofilas libres que son inestables en medios alcalinos (15).

Los cultivos de tejidos tienen una ventaja sobre la utilización de plantas silvestres, ya que se puede tener un adecuado control de calidad, así como disminuir los largos periodos de floración (2).

3.2 ASPECTOS GENERALES DE LA FLOR DE CEMPASUCHIL

En México se tiene una flor indígena que debido a sus pigmentos es altamente apreciada en las industrias alimentaria, farmacéutica y avícola. Debido a que es una fuente importante de luteína, es comercializada por diversas compañías extranjeras y nacionales.

Esta flor es conocida como "Flor de muertos" en el Valle de México y también nombrada con su antiguo nombre azteca de Cempasúchil (alteración del nombre azteca, Cempoalxochitl).

De acuerdo con la "Enciclopedia Agrícola" y de conocimientos afines pertenece al género *Tagetes* de la familia de las compuestas. Se incluyen en él unas 20 variedades distribuidas en América, desde el norte de México hasta la República de Argentina.

Es un cultivo que desarrollaron los aztecas a partir de especies nativas, por lo tanto es realmente una planta mexicana, siendo más correcto llamarla *Caléndula mexicana*, y que hoy en día es usada en ceremonias del mes de Noviembre dedicadas a los difuntos. Además presenta usos diversos en la medicina popular (como antiespasmódico, insecticida, antihelmífica, irritación de ojos, empacho etc..) (16).

3.3 GENERALIDADES DE LIPASAS.

Las lipasas son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los acil-glicéridos que se encuentran emulsionados; son activas en la interface agua-lípido y sólo atacan la superficie de los glóbulos de grasa que están en contacto con la fase acuosa sin afectar el interior de los mismos. Se diferencian de las esterasas en que estas últimas solamente actúan sobre ésteres solubles en agua dando como productos *ácidos grasos libres, glicéridos parciales y glicerol*(17).

En cualquiera de los casos, la reacción es reversible, lo cual implica que pueden efectuarse alternativamente reacciones de hidrólisis o de síntesis, en función del potencial químico de las especies presentes(17).

Las reacciones catalizadas por lipasas son: hidrólisis de grasas, la cual es utilizada para la producción de ácidos grasos, esterificación e interesterificación de grasas y otros lípidos para la preparación de diversos productos de alto valor comercial en la industria.

A partir de la década de los 80's las reacciones catalizadas por lipasas fueron propuestas para la preparación de una amplia variedad de productos específicos de alto valor comercial, los cuales no pueden ser preparados convenientemente por síntesis química.

Por ejemplo, los ácidos grasos polinsaturados que pueden ser utilizados como productos dietéticos, los cuales son preparados bajo condiciones de hidrólisis suaves de aceites marinos o aceites de ciertas plantas con lipasas no específicas. Un ejemplo de estos son los ácidos grasos ω -3 (18).

Algunos ácidos grasos de cadena larga monosaturados como el gadoleico, erúico y nervónico los cuales tienen un alto valor comercial en la industria oleoquímica, son preparados por hidrólisis parcial de aceite de crucíferos con Lipasas sn 1-3, específicas (Ver fig. 7).

Los monoacilglicérols son usados como emulsificantes y se pueden obtener por medio de reacciones de esterificación con lipasas. La interesterificación de grasas con lipasas específicas sn1-3, puede producir sustitutos de manteca de cacao (ver fig. 8).

La mayor ventaja de las reacciones catalizadas por lipasas sobre las que se llevan a cabo por catálisis química, es la amplia variedad de productos que se pueden obtener, de diferente composición y propiedades, dependiendo de la regioespecificidad de la enzima por el sustrato.

Otra de las ventajas que ofrecen, son las condiciones suaves de reacción, con lo cual hay una reducción en el consumo de energía y un menor daño térmico a los reactantes y productos (18).

3.3.1 HIDRÓLISIS

La reacción de hidrólisis se da con la finalidad de preparar alcoholes y ácidos grasos libres a partir de ésteres (ver fig. 7).

En la práctica industrial, las grasas son hidrolizadas a temperaturas de 250°C y presiones de 60 bar. Bajo estas condiciones los ácidos grasos polinsaturados se descomponen y dan productos poliméricos indeseables como cetonas y compuestos hidrocarbonados.

Existen diversas técnicas para el incremento de la velocidad de hidrólisis de las grasas. Por ejemplo, combinaciones de lipasas de *Penicillium* y *Rhizopus niveous* o *Penicillium sp* con *Rhizopus delemar* dan rendimientos mucho mayores que si se utilizan estas lipasas de manera individual. Otra técnica usada es la inmovilización de lipasas(18). El uso de solventes orgánicos en el medio de reacción, como el isooctano, ciclohexano, o acetona, incrementa la velocidad de hidrólisis de las lipasas en los triacilglicerotes (18,20,21). Existen numerosas investigaciones de lipasas en medios no convencionales. La cinética y los aspectos termodinámicos de las reacciones catalizadas por lipasas en solventes orgánicos anhidros y en sistemas bifásicos han sido ampliamente revisados (22,23,24).La mezcla bifásica consiste de una fase lipofílica, rica en acilglicerotes y ácidos grasos, y una fase hidrofílica compuesta por el glicerol formado y la lipasa. En este tipo de sistema la reacción ocurre en la interfase.

Hidrólisis y esterificación

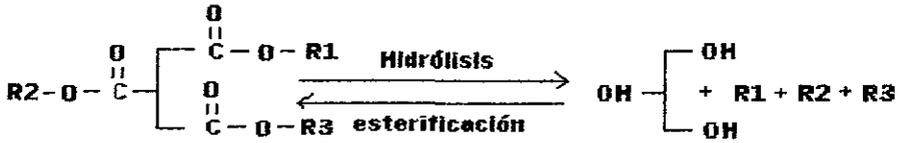


Fig 7. Reacción de hidrólisis y esterificación con una lipasa no específica

3.3.2 ESTERIFICACIÓN

En la reacción de esterificación se obtienen como productos ésteres a partir de alcoholes y ácidos grasos (ver fig7). Las reacciones de esterificación se pueden llevar a cabo usando lipasas en un medio orgánico. En estos sistemas el contenido de agua y la actividad de agua juegan un papel muy importante en el equilibrio de la reacción (25).

La esterificación al igual que la hidrólisis se puede llevar a cabo en un sistema bifásico utilizando reactores de membrana o micelas reversas.

La esterificación o transesterificación catalizadas por lipasas se han usado ampliamente para la preparación de ésteres de cadena corta, cadena mediana como el etil propionato , isobutilacetato, isoamilacetato, prenil 2 metilpentanoato y ésteres de alcoholes con terpenos como el mentol y el geraniol los cuales son usados como saborizantes en la industria alimentaria (18).

Otra ventaja es la posibilidad de obtener productos con cierta estereoespecificidad. Esta propiedad se ha usado para preparación de isómeros *cis-trans*. Otra posible aplicación es en la síntesis de ésteres de ácidos grasos y carbohidratos, los cuales pueden ser utilizados como emulsificantes, (ésteres de sacarosa, glucosa, fructosa, sorbitol), y se han reportado buenos rendimientos utilizando una lipasa de *Cándida rugosa* para su preparación (18). Las reacciones de esterificación con lipasas pueden producir ceras, como la jojoba la cual tiene un alto valor comercial (ver fig 8).

3.3.3 INTERESTERIFICACIÓN

Existen dos tipos de reacciones de interesterificación: la ácidolisis y la alcoholisis. En la primera se sustituye un ácido graso no deseable en la molécula por otro, y en el segundo caso se sustituye un ácido graso con un alcohol. (Ver fig 8).

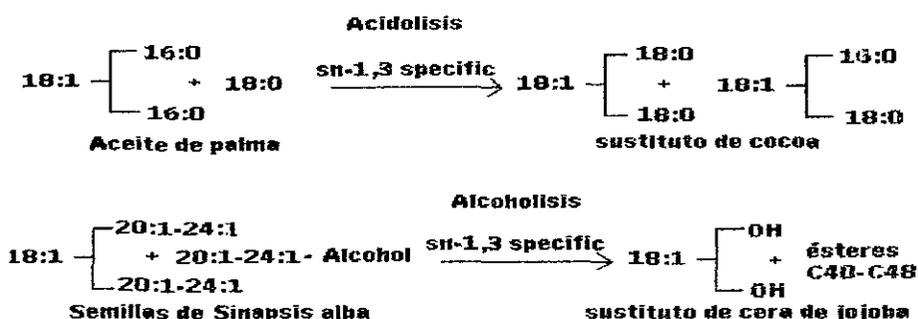


Fig 8 Aplicaciones de las reacciones de intraesterificación catalizadas por lipasas

En general la interesterificación se lleva a cabo con lipasas inmovilizadas en un medio con o sin solvente orgánico; se debe tomar en cuenta parámetros como el contenido de agua y el tipo de solvente (22).

3.4 GENERALIDADES SOBRE BIOCATALISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

Debido a que la perspectiva de uso y espectro de acción de las enzimas ha aumentado considerablemente a partir de que se descubre que la actividad enzimática no está limitada a llevarse a cabo en medio acuoso, la enzimología no acuosa ha tenido un rápido desarrollo. Esto se ha reflejado en un crecimiento explosivo de las publicaciones de estos tópicos (26). Las enzimas pueden presentar actividad catalítica en sistemas muy alejados de ser simples soluciones diluidas, pudiendo ser la fracción mayoritaria una fase orgánica, una fase gaseosa o un fluido a alta presión. Estos sistemas se conocen como medios no convencionales (MNC) (22).

En 1966 aparece la primera publicación de una reacción catalizada en fase orgánica (27), y no es sino hasta la década de los 80's cuando se estudian con mayor intensidad y se dan a conocer la mayoría de los trabajos relevantes. El uso de estos MNC se ha impulsado a partir de que numerosos compuestos orgánicos de alto valor agregado son poco solubles en medios acuosos.

Los factores claves que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos son el estado iónico de la enzima, la inmovilización enzimática, el estado de hidratación del biocatalizador, el solvente, contenido de agua en el sistema y la transferencia masa (26).

3.4.1. FACTORES DETERMINANTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

3.4.1.1 AGUA.

Un tema común en todos los estudios de enzimas en medios orgánicos es la cantidad de agua asociada con la enzima, ya que juega un papel clave en propiedades como actividad, estabilidad y especificidad. El control de la cantidad y la localización del agua es crítico para tener una aplicación exitosa en un sistema catalítico no acuoso. El agua es necesaria para la adquisición y el mantenimiento del sitio activo de la enzima en solventes orgánicos anhidros. Generalmente los solventes orgánicos hidrofóbicos requieren menor cantidad de agua para la actividad enzimática .

La adición de agua en preparaciones sólidas de enzima incrementa la polaridad y flexibilidad del sitio activo, pero el agua también está involucrada en muchos procesos de inactivación de las enzimas. La dependencia de la actividad de la enzima con diferentes actividades de agua varía de enzima a enzima (25).

Cuando las reacciones son llevadas a cabo en medios orgánicos, el agua está distribuida entre las diferentes fases presentes.

Algunas moléculas de agua están unidas a la enzima, y por lo tanto tienen una gran influencia en la actividad catalítica; otras moléculas están disueltas en el solvente y en los soportes o sustancias que puedan tener la capacidad de absorber agua.

La cantidad de agua en la mezcla de reacción puede ser medida de diferentes maneras. Uno de los más comunes es la medición de la concentración de agua como % ó mol/l. Sin embargo, el conocer la concentración total del agua no dice mucho sobre la hidratación de la enzima. El mejor camino para caracterizar el grado de hidratación del biocatalizador en un medio orgánico es el uso del parámetro termodinámico conocido como *Actividad de agua (a_w)* definida como la relación entre la presión de vapor del sistema de reacción y la presión de vapor del agua pura bajo las mismas condiciones (22,23,28). La actividad de agua determina cómo está el agua unida a la enzima.

En caso de lipasas se conoce que a bajos niveles de a_w el equilibrio termodinámico se desplaza hacia reacciones de síntesis y se favorecen las reacciones de hidrólisis a niveles altos de a_w .

Se sabe que a a_w bajos, de 0.2-0.3, las enzimas pueden tener actividad, gracias a que se forma una monocapa de agua alrededor de éstas (23).

3.4.1.2 pH Y TEMPERATURA

Para que las enzimas tengan un adecuado funcionamiento deben funcionar a una temperatura y pH óptimos. El pH es importante porque determina el correcto estado de ionización de la enzima, dando como consecuencia una flexibilidad adecuada del sitio activo. En reacciones en fase acuosa, el pH es controlado por el tipo de buffer seleccionado, así como también su concentración. En reacciones en fase orgánica el estado de ionización de la enzima debe de ser alcanzado en la preparación liofilizada. Esto se realiza ajustando el pH de la solución la cual se va a liofilizar. La enzima adquiere el estado de ionización de la solución acuosa. Esto ha sido llamado " pH memoria" de la enzima (26).

3.4.1.3 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.

Los liofilizados enzimáticos en polvo son convenientes para muchas aplicaciones catalíticas. Sin embargo, las partículas de enzima algunas veces tienden a agregarse y adherirse a las paredes del reactor, especialmente cuando la enzima está hidratada. Estos problemas pueden ser reducidos por inmovilización de la enzima en un soporte sólido, encontrándose en muchos casos que la actividad catalítica de la enzima es mayor que el polvo de enzima, debido a que la enzima, al estar inmovilizada, tiene una mayor superficie de contacto y por lo tanto sus sitios activos están más expuestos, además de que se facilita la transferencia del sustrato a la enzima.

El soporte protege a la enzima de una inactivación irreversible durante el secado o liofilización, además de crear un microambiente favorable para la enzima. Con la enzima inmovilizada en un soporte se facilita la recuperación para su posible rehuso posterior. Para aplicaciones prácticas, las propiedades mecánicas del soporte tiene gran importancia, Por ejemplo, las partículas frágiles no deben de ser usadas en reactores que necesitan agitación. El precio del soporte es un factor importante especialmente en aplicaciones a gran escala (26,28).

Existen diferentes procesos de inmovilización los cuales se clasifican en la forma descrita en la figura 9.

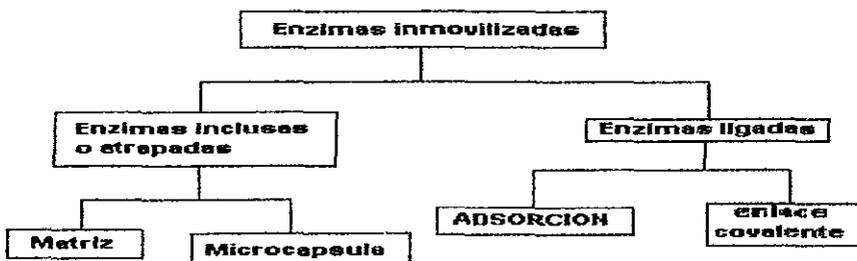


Fig. 9 Clasificación de los diferentes métodos de inmovilización (28).

3.4.1.4 SOLVENTE

La naturaleza del solvente orgánico es otro factor importante en la enzimología no acuosa. El solvente no solamente afecta la actividad y estabilidad de la enzima, sino que altera la especificidad de ésta (incluyendo la especificidad del sustrato, enantioselectividad, selectividad proquiral, regioselectividad y quimoselectividad). En general, el solvente afecta la actividad de la enzima vía interacción con agua, enzima, sustratos y productos.

Las enzimas y solventes compiten por el agua. Los solventes de naturaleza hidrofílica son capaces de secuestrar moléculas de agua que se encuentran unidas a la enzima, impiden una hidratación suficiente de la molécula y propician una disminución de su actividad (25). El despojo del agua de la enzima por el solvente está relacionado con la polaridad del solvente. Por ejemplo el metanol desorbe alrededor del 60% del contenido de agua unida a la enzima y el hexano solamente el 0.5%.

Las moléculas de solvente pueden penetrar dentro del sitio activo de la enzima, disminuyendo la polaridad local del sitio activo, lo que tiene como consecuencia una repulsión electrostática entre la enzima y el sustrato.

Los solventes pueden alterar la concentración de sustratos y productos en la capa acuosa de la enzima. Los sustratos deben penetrar en esta capa para que la reacción pueda ocurrir, y los productos deben salir de la capa(26).

MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 SUSTRATO.

Se trabajó con un purificado de harina de flor de Cempasúchil, el cual fue proporcionado por Bioquímex Reka (Querétaro, México). Está constituido por un 85 % de diésteres de luteína, y el restante un 15 % otros constituyentes como triacilglicéridos.

Para evitar su degradación se almacenó empacada al vacío a 4 ° C, en un cuarto oscuro.

4.1.2 ENZIMA

La lipasa de *Cándida cylindracea* fue adquirida de la compañía SIGMA Chemical Co, con las siguientes características:

Actividad de 835 unidades / mg sólido. Una unidad se define como un microequivalente de ácido graso de aceite de oliva / hora a 37 ° C, pH de 7.2.

La enzima comercial tiene lactosa como excipiente, y no se utilizó ningún método de purificación para su eliminación.

4.1.3 SOPORTE

La amberlita IRA-400 fue adquirida de Sigma Chemical Co. Con las siguientes características: (ver tabla IV)

Tabla IV Características del soporte.

Grupo Activo:	Amina cuaternaria
Efectividad	PH: 0-14 Temperatura máxima : 60° C
Forma Iónica	cloruro
Contenido de humedad	46%
Capacidad	3.8 meq / g

La interacción de la enzima con el soporte es por cargas. El grupo activo del soporte (amina) interactúa con las cargas negativas de la enzima .

Se eligió un soporte **a)** hidrofílico para proporcionar agua como reactivo a un sistema completamente hidrofóbico como es el hexano **b)** gelificado para evitar su destrucción durante la agitación mecánica.

4.1.4 SOLVENTES Y OTROS

- Solventes: Hexano, acetona, acetato de etilo y etanol grado reactivo analítico y HPLC, se adquirieron de Mallinkrodt.
- Estándar de colorantes de la flor de Cempasúchil: Se utilizó un saponificado industrial, el cual contiene una mezcla de diésteres, monoésteres y luteína, proporcionado por Bioquimex.
- Sulfato de sodio anhidro grado reactivo, de Mallinkrodt.
- Buffer trizma base (tris(hidroximetil amino metano) grado reactivo Se adquirió de Sigma Chemical Co.
- Albúmina: se adquirió de Sigma Chemical Co.

4.2 EQUIPO

- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 uv/visible.
- Potenciometro Corning modelo pH meter 320
- Balanza analítica OHAUS con 5 decimales modelo AP2105
- Agitadores magnéticos tipo Thermolyne stir plate
- Baño Metabólico controlado Heto, modelo Cb13-25E
- Tanque de nitrógeno Aga ONU con 95% de pureza.
- Rotavapor R-124 Buchi Waterbath B-481
- Placas de sílica gel de vidrio adquiridas de Merck
- Placas de sílica gel de aluminio modelo 25 DC-Alufolien 20 x 20 , Kieselger 60 F254. Adquiridas de Merck.

- Cromatógrafo HPLC con detector de arreglo de diodos, marca Hewlett Packard serie 1100.

4.3 MÉTODOS.

Para el análisis experimental se usaron las siguientes metodologías: TLC, Espectroscopia, HPLC.

4.3.1 ESPECTROSCOPÍA.

Con esta técnica se estudió la degradación del diéster , por medio de barridos de 200 nm – 800 nm (región u.v- visible).

Debido a que no existió ninguna diferencia en los espectros de los diferentes compuestos de los diferentes productos de reacción, no se utilizó esta técnica para diferenciarlos (ver fig.10).

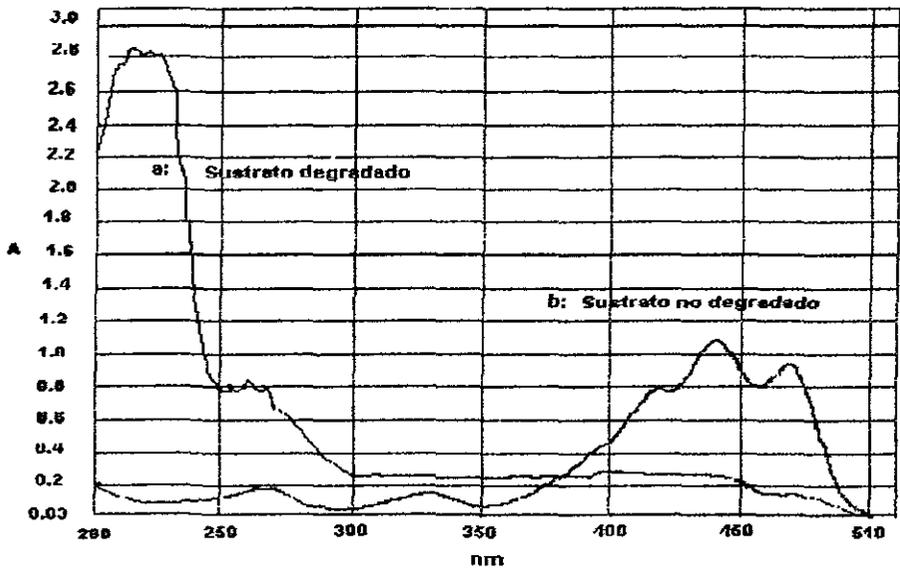


Fig. 10. Espectro de absorción para el diéster de luteína en Hexano. Para la degradación del sustrato, se empleó calentamiento a 40 °C por 72 hr en fase acuosa. a=sustrato degradado, b=sustrato no degradado.

En la región del visible los 3 picos característicos del sustrato no degradado son: 440, 445, 475 los cuales concuerdan con la literatura (15). A 330 nm se observan isómeros *cis* de los carotenos (los cuales son productos de degradación).

Existe una pérdida de color durante los experimentos debido a las condiciones manejadas.

Esto se observa por una disminución de absorbancia en la región del visible, así como por un aumento de absorbancia en la región UV, debido a la formación de productos de degradación incoloros, siendo el más común la β -ionona.

4.3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Se aplicó esta técnica para el monitoreo cualitativo de las reacciones y purificación de estándares (diésteres, monoésteres, luteína).

4.3.2.1 PURIFICACIÓN DE ESTÁNDARES

El saponificado industrial se extrajo con 100 ml de éter y luego se agregaron 100 ml de agua. Se desechó la fase acuosa que contenía jabones principalmente. Luego la fase orgánica se evaporó y se aplicó en la capa fina preparativa.

Cromatografía preparativa.

Se requirió una purificación de estándares para su posterior aplicación en HPLC. Se siguió la siguiente metodología.

- Activar la capa fina de vidrio a 110 ° C por 10 min, con el objeto de eliminar la humedad y así asegurar una adecuada separación de los componentes.
- Saturar la cámara de elución, con la fase móvil (70:30 Hexano-acetato de etilo).

- Aplicar el estándar sobre la placa activada y eluir ésta en la cámara.
- Una vez separadas las bandas de los compuestos visibles a simple vista , rasparlos y disolverlos en una mezcla de solventes (hexano-acetato de etilo 70: 30) . Secar las muestras con sulfato de sodio anhidro. Determinar sus r_f (ver tabla V).

Filtrar las muestras y evaporar con N_2 a sequedad, para su posterior almacenamiento en una atmósfera inerte.

Tabla V.Desplazamientos químicos.

Compuesto	r_f
Diéster	0.87
Monoéster apolar	0.5
Monoéster polar	0.46
Luteína	0.2

En la siguiente figura se muestra una representación pictórica de una capa fina típica.

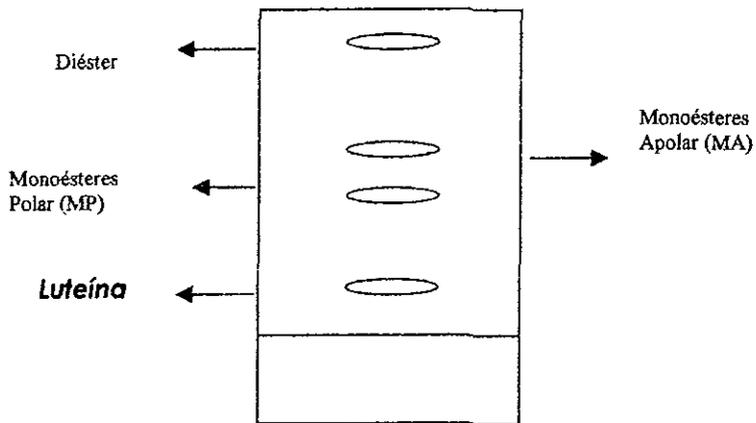


Fig.11.Diagrama de capa fina

En la figura 11. Se observa que primero eluye el diéster, el cual es de naturaleza no polar. La luteína, que es más polar, eluye hasta el final. Con respecto a los distintos monoésteres, su polaridad es muy semejante entre ellos ya que sus R_f son muy cercanos. Para diferenciarlos en los análisis, se definen como monoésteres apolares (MA) los que están cercanos al diéster, y monoésteres polares (MP) los que están cercanos a la luteína.

4.3.2.2 CROMATOGRAFÍA CUALITATIVA

Se llevó a cabo en placas de aluminio de sílica gel, con el objetivo de monitorear los productos de reacción. La metodología que se siguió fue la misma que en la sección 4.3.2.1, pero no se rasparon las muestras.

4.3.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Esta técnica se utilizó para monitorear y cuantificar los productos de las reacciones, así como para medir la degradación del sustrato. La cuantificación se llevó a cabo por normalización de áreas.

Las condiciones del HPLC fueron las siguientes:

Columna Nucleosil sílica 150 mm x 4,5 mm con poro de 5 micras. Lectura del detector λ 448,16 y λ 540,10 nm.

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo: Acetona,

65:30:5

Flujo: 1.5 ml / min

Volumen de inyección 20 μ l

La medición se realizó a temperatura ambiente.

4.3.4 PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Se preparó un biocatalizador para aplicarse tanto en fase acuosa como en fase orgánica.

Se inmovilizó la enzima, por adsorción, monitoreando a 280 nm la disminución de absorbancia en el sobrenadante (máximo de absorción de aminoácidos aromáticos). Con esta metodología no se logró una adsorción adecuada del biocatalizador, por las siguientes razones:

Se requería una gran cantidad de enzima para conseguir la concentración adecuada en el soporte. A pesar de llevar a cabo adsorciones sucesivas sobre el mismo soporte, no se consiguió enriquecer su concentración en proteína.

Para resolver los problemas mencionados, se inmovilizó por liofilización directa una mezcla de soporte con enzima, como se describe a continuación.

4.3.4.1 LAVADO DEL SOPORTE

Este lavado se hizo con el objetivo de eliminar impurezas. Se pesó una determinada cantidad de soporte y se suspendió en una solución amortiguadora de trizma – base 0.05 M (pH 7.2) agitándola por 10 min.

- La solución se dejó sedimentar y se decantó el excedente acuoso.
- Se repitieron los dos pasos anteriores tres veces.
- El soporte fue lavado con sosa 10 mM y posteriormente con solución de HCl 10 mM para eliminar impurezas y acondicionar las cargas.

4.3.4.2 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA DE *CANDIDA CYLINDRACEA*

La técnica empleada para inmovilizar a la enzima fue la siguiente:

- 14 gr. de soporte limpio se mezclaron con 30 ml de una solución de enzima, con una concentración de 72.33 mg/ml, para obtener una concentración de 0.155g / g soporte.
- El preparado enzimático se liofilizó para eliminar el remanente de agua.
- Una vez seco el catalizador enzimático se almacenó a una temperatura de -5°C , para su uso posterior en fase acuosa y orgánica.

4.3.5 HIDRÓLISIS EN FASE ACUOSA

Se llevó a cabo con el fin de comprobar si la enzima es afin al diéster como sustrato (15), así como saber si el sistema de inmovilización resultaba en inactivación de la enzima.

Se preparó una solución de sustrato de 0.05 mg / ml para lo cual se pesaron 5 mg de sustrato (purificado de diésteres de luteína), y se disolvieron en 1 ml de acetona.

- Se colocaron 2 gramos de soporte con aprox. 155 mg enzima/ g soporte en un matraz bola de 100 ml. Se adicionaron 99 ml de una solución amortiguadora trizma base 0.05 M, pH 7.2
- Se agregó 1ml de la solución de sustrato. Se burbujeó N₂ para eliminar el oxígeno, calentando la reacción a una temperatura de 40 ° C con agitación magnética constante.
- Se monitoreó la reacción en un intervalo de tiempo de 0 – 120 hr, tomando 5 ml cada 24 hr de muestra para su posterior extracción.
- Se extrajo el colorante de la muestra de reacción con 15 ml hexano/ etanol 2:1
- La fase acuosa se desechó, se eliminó el exceso de agua de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro.
- Por último, se evaporó la muestra con nitrógeno y se almacenó en refrigeración, para su posterior análisis por HPLC y cromatografía en capa fina.

4.3.5.1 EFECTO DE LA ALBUMINA SOBRE EL SUSTRATO

Se observó que la enzima en fase acuosa estabiliza al colorante, ya que la degradación de este sin enzima es más notorio, perdiendo completamente el color a las 24 hr. Debido a ésto, se penso en comprobar si la enzima, al ser de naturaleza proteica, estabilizaba al colorante. Por lo anterior se probó la estabilidad del colorante con albúmina. Para estudiar este efecto la metodología fue la misma que la empleada para el estudio de la reacción en fase acuosa, sustituyendo con 5% de albúmina, a la enzima.

4.3.6 HIDRÓLISIS EN FASE ORGÁNICA

Esta reacción se llevó a cabo en hexano, porque es el solvente con el cual se extrae el colorante de la flor industrialmente, además de ser el solvente en el cual es más soluble el diéster.

- Se pesaron 3 mg de sustrato y se disolvieron en 100 ml de hexano
- Se mezcló la solución anterior con 2 gramos de biocatalizador preparado como se indica en la sección 4.3.4 debido a que el hexano es un sistema hidrófobico. El biocatalizador fue hidratado previo a la reacción por 72 hr a un aw de 0.98 a temperatura ambiente .
- Se llevó a cabo la reacción a 40°C con agitación constante, monitoreando ésta cada 24 hr en un intervalo de tiempo de 0-120hr.
- Las muestras se llevaron a sequedad con N₂, para su posterior análisis por HPLC y cromatografía en capa fina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 REACCIÓN ENZIMÁTICA EN FASE ACUOSA.

Con el objeto de establecer el grado de especificidad de la enzima de *Candida Cylndracea* por diésteres de luteína en reacciones de hidrólisis, se llevó a cabo una reacción en medio acuoso. Resultados previos de Matzuno (15) indican la factibilidad de esta reacción, si bien a concentraciones altas de esta enzima. La mezcla de enzima inmovilizada en amberlita y sustrato previamente disuelto en acetona, fue incubada a 40 ° C y bajo flujo constante de nitrógeno para reducir la degradación de colorante.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla VI, donde M1 y M2 corresponden a los monoesters no polares y M3 corresponde al monoester polar. Se observa que la hidrólisis es detectada a un tiempo de sólo 0.75 hr, llegando a obtenerse casi un 2% de luteína.

Tabla VI. Distribución de productos.

Tiempo hr	Consumo de diéster.	M1 %	M2 %	M3 %	Luteína %
0	0	0	0.2470	0.8706	0
0.75	6.6	0.3226	0.5320	3.7860	1.96
5.0	20.37	0.3289	2.400	9.4490	8.61
8.45	25.88	0.3705	2.5300	10.1225	13.81
24.00	35.12	0.4229	3.160	12.4600	18.38
30.00	36.8	0.4253	3.168	12.4870	18.42
72.00	44	0.6800	3.1517	10.50	27.70

La figura 12 presenta el cromatograma de HPLC obtenido para la muestra de reacción correspondiente a las 24 hr.

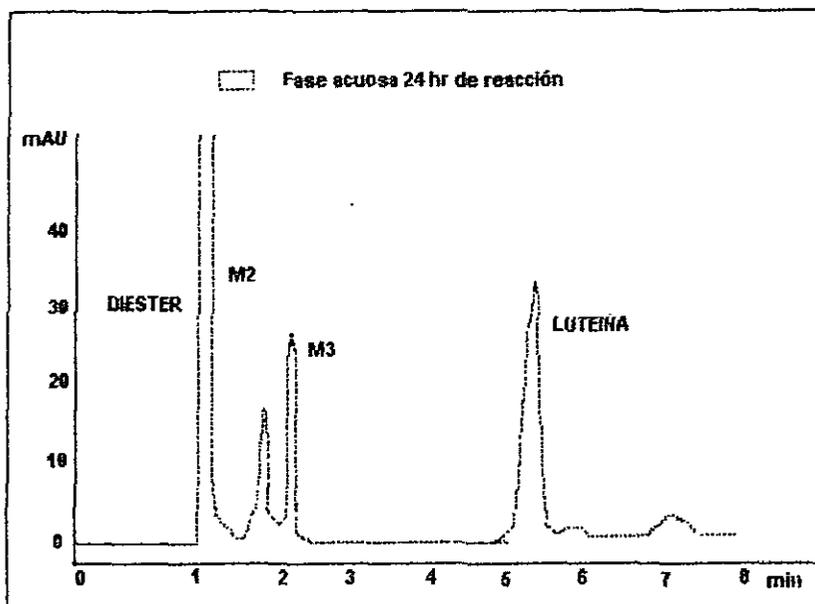


Fig 12. Cromatograma de los productos de reacción en fase acuosa

Claramente esta metodología analítica permite una adecuada separación y el área bajo la curva para la luteína corresponde al 18% en peso.

Los datos de la tabla VI se presentan en forma gráfica en la Figura 13. Puede apreciarse que la hidrólisis continúa hasta alcanzarse un 28% de luteína a las 72 horas de reacción.

La producción de luteína obtenida por el método en fase acuosa es de bajo rendimiento, si lo comparamos con el método de saponificación oficial del AOAC con el cual a 56°C, 20 min. se logra un 100% de conversión.

Es notorio que la producción de M3 procede con mayor rapidez que las formas no polares, sugiriendo un cierto grado de discriminación de la enzima por los ácidos grasos sustituyentes. Sin embargo, desconocemos la composición de los diésteres en la preparación inicial para distinguir un efecto claro de especificidad de otro resultante de la distribución de diésteres. En todo caso, la reacción es suficientemente lenta para reflejar dos pasos distintivos de hidrólisis que llevan primero al monoéster y posteriormente al diol final (luteína).

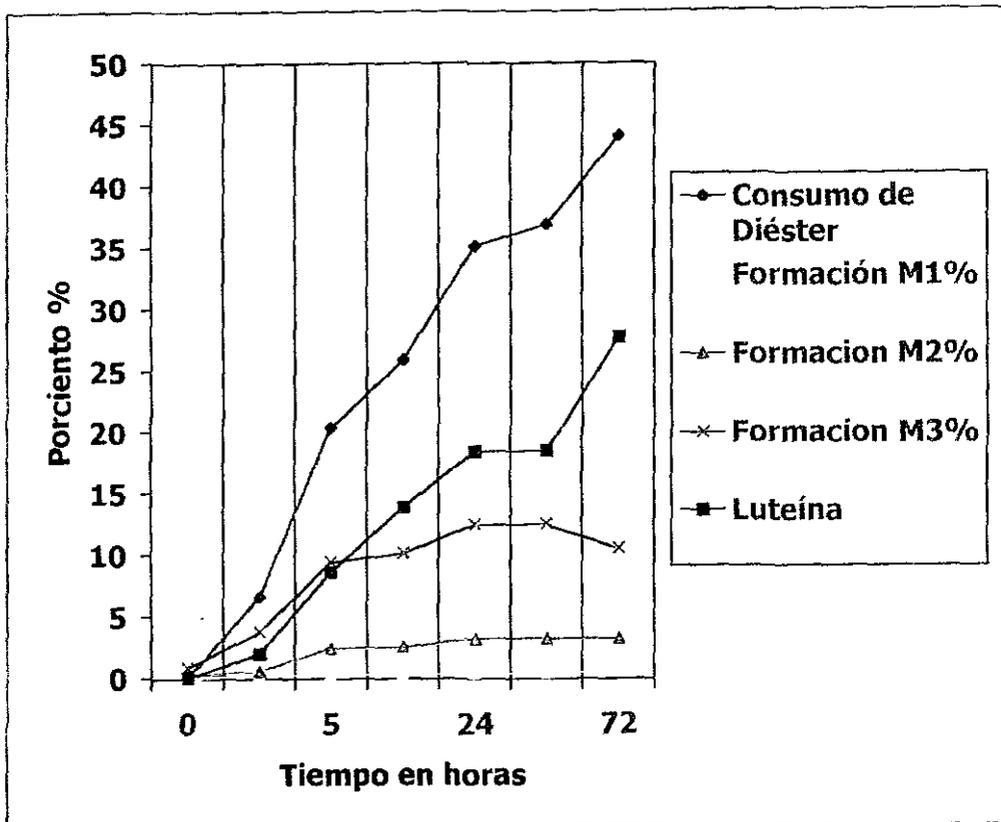


Fig 13. Caracterización en fase acuosa. Formación de productos de reacción en fase acuosa, con respecto al tiempo.

5.2 REACCIÓN ENZIMÁTICA EN FASE ORGÁNICA

Como se indicó previamente, lograr la hidrólisis vía lipasas del diéster en un medio orgánico como el hexano representa un reto con importantes ventajas potenciales sobre la hidrólisis en medio acuoso, como la extracción-hidrólisis en un solo paso, la eliminación del uso de potasa o sosa y el evitar la formación de jabones saponificados como subproducto. Para ello es indispensable contar en un medio de reacción con la suficiente cantidad de agua para garantizar a) la demanda estequiométrica de la reacción de hidrólisis, b) un nivel de hidratación en la enzima que permita expresar su actividad por el sustrato. En este caso, la solubilidad del diéster es mejorada en hexano, si bien la enzima puede disminuir notablemente su nivel de interacción con el solvente (hexano vs. Agua). En este sentido no existen reportes en la literatura que demuestren la factibilidad de la reacción de hidrólisis en medio orgánico.

Para contar con una idea del nivel de agua requerido para la reacción de hidrólisis, se llevó a cabo un balance aproximado del agua en el sistema. Datos de la literatura indican que el nivel de saturación del agua en hexano a 40°C es 0.04 microlitros/ml (25). Si despreciamos el agua necesaria para hidratar a la enzima, bajo el argumento de que una monocapa puede ser suficiente para lograr la expresión de la actividad (ver Generalidades), toda el agua que pueda incorporarse al sistema deberá estar disponible para la hidrólisis.

Como se indicó en la sección de materiales, la enzima fue inmovilizada en amberlita, soporte hidrofílico con una alta capacidad de retener agua. Con el objeto de mantener un nivel de agua constante en diferentes pruebas de reacción, el biocatalizador liofilizado fue prehidratado en cámaras herméticas a una humedad relativa constante de 97% (obtenida con una solución saturada de sulfato de potasio) a temperatura ambiente. La hidratación fue monitoreada a diferentes tiempos y la ganancia en peso determinada por gravimetría (ver fig 14).

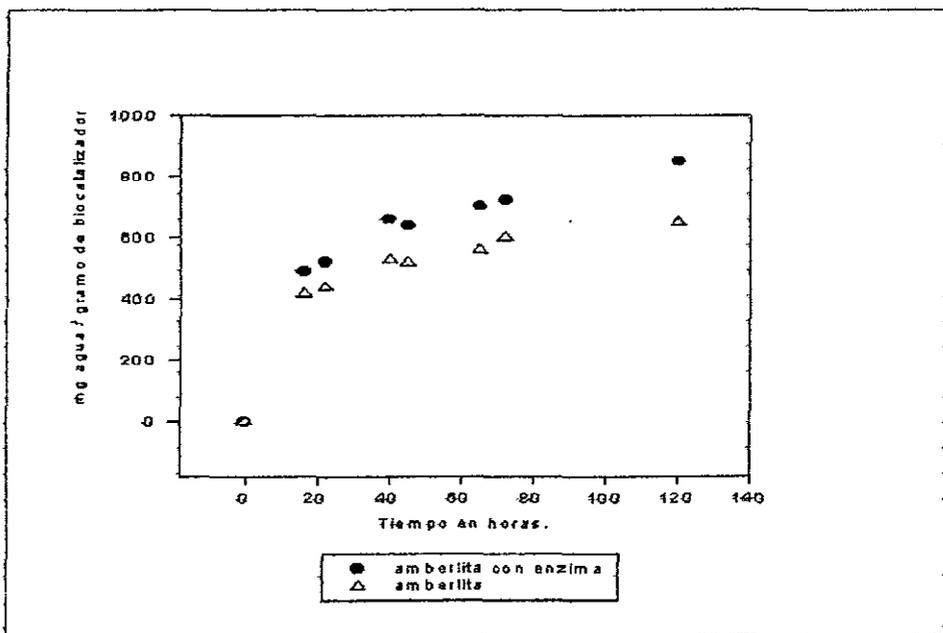


Fig. 14. Curva de saturación con la amberlita gelificada a un A_w de 0.97. Hidratación del biocatalizador en una atmósfera controlada de sulfato de potasio a temperatura ambiente.

Se observa que la contribución de la enzima como agente de hidratación no rebasa el 10% en la mayoría de los casos. El proceso es lento requiriendo un mínimo de 80 horas para alcanzar el equilibrio, evaluado como una constancia en el contenido del agua al aumentar el tiempo de contacto. A estas condiciones, la ganancia en agua es de 700 mg agua/g de soporte. Dado que solo se requieren 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para saturar al hexano, es de esperarse que esta agua sea suficiente para promover las reacciones de hidrólisis, si bien se desconoce la distribución precisa del agua en el sistema (soporte, enzima, espacio de cabeza, solvente, sustratos, acetona) una vez puestos en contacto todos los componentes.

El catalizador prehidratado a una A_w de 0.97 fue empleado en la reacción en fase orgánica y con hexano prehidratado en un embudo de separación. Los resultados se muestran en la figura 15 y tabla VII.

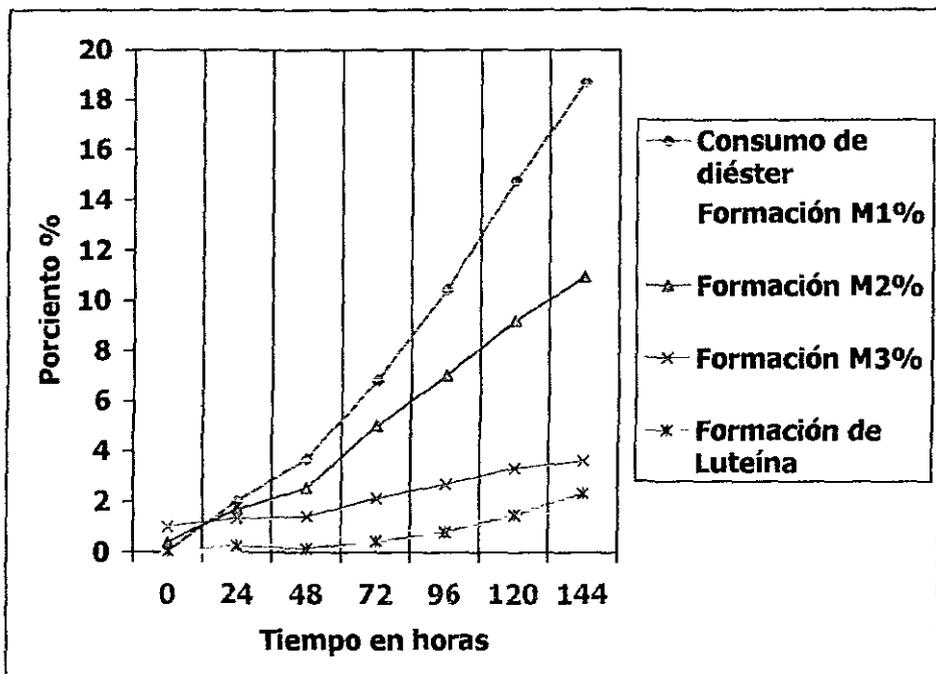


Fig 15. Caracterización en fase orgánica. Formación de productos de reacción con respecto al tiempo.

Se observa que la reacción transcurre con el tiempo si bien con una velocidad disminuida con respecto a la reacción en fase acuosa. Las muestras a tiempos menores a 24 horas no mostraron suficiente resolución para comprobar la presencia de productos de reacción.

Tabla VII Distribución de productos

Tiempo hr	Consumo del Diéster%	M1%	M2%	M3%	Luteína
0	0	-	0.37	0.96	-
24	1.97	-	1.66	1.30	0.209
48	3.65	0.65	2.5	1.4	0.13
72	6.81	0.65	4.98	2.10	0.41
96	10.41	1.087	6.98	2.66	0.76
120	14.72	1.411	9.17	3.29	1.46
144	18.65	1.7	10.9	3.6	2.6

A partir de este tiempo los productos aumentan progresivamente apareciendo la luteína a las 50 horas y continuando en aumento hasta las 144 horas en que se detuvo la reacción donde se alcanzó un 2.6% en peso. Es importante notar que en el medio orgánico, a diferencia del acuoso, el aumento de los monoésteres no polares M2 progresa con mayor rapidez que los M3 polares.

Este aparente cambio de especificidad refleja la importancia del solvente en la interacción enzima-sustrato, afectando las constantes de adsorción. El cromatograma de HPLC para la muestra obtenida a las 144 horas de reacción se presenta en Figura 16.

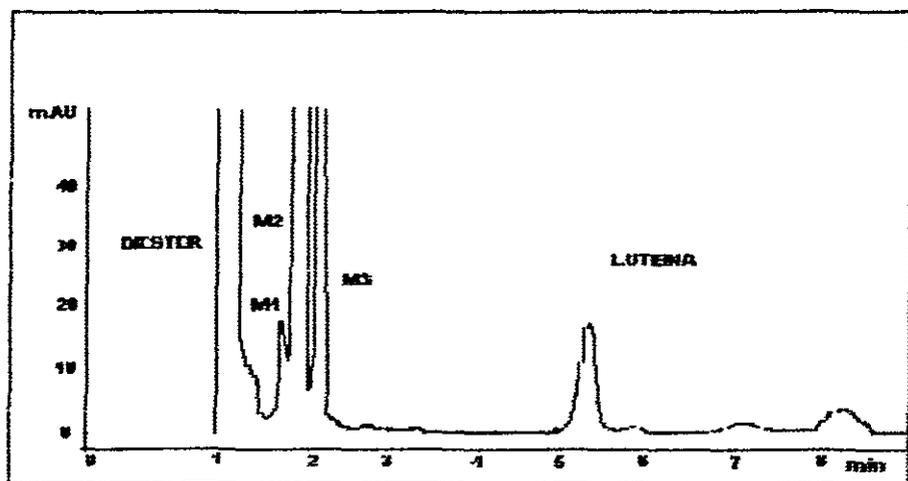


Fig. 16. Cromatograma de los productos de reacción en fase orgánica a las 144 horas de reacción.

La actividad residual de esta muestra fue determinada al recuperar por filtración la enzima después de 144hr, y lavada con buffer pH 7.3. Con esta muestra se evaluó la actividad en el medio acuoso.

Al hacer esto se obtuvo una conversión marginal lo que sugiere que la enzima se desactiva con cierta facilidad al ubicarse en el medio orgánico.

Los resultados de actividad obtenidos se presentan en la tabla VIII

Tabla VIII comparación de la aparición de la Luteína en diferentes sistemas de reacción.

Sistema de reacción	MAU de luteína
Fase acuosa	35
Fase orgánica	18
Actividad residual	1

Esto podría explicar la baja conversión alcanzada en comparación con la reacción en fase acuosa. Otras posibles causas, actuando simultáneamente o en forma independiente son:

- La mayor solubilidad o contacto enzima-agua hace más eficiente a la enzima.
- En fase acuosa el sustrato se encuentra emulsionado, lo que favorece la acción de las lipasas en la interfase. En fase orgánica, al no haber emulsión se elimina la posibilidad real de acción de la lipasa.

En el medio orgánico ocurre una aglomeración del biocatalizador favorecido por la alta hidratación con que fue acondicionado. Esto reduce el contacto de la enzima con el sustrato.

- A pesar de que la cantidad de agua en medio orgánico parece ser suficiente, podría ocurrir un equilibrio entre reacciones de hidrólisis y de síntesis que llevan a una baja producción de luteína. Esto para tiempos cortos en los que la inactivación de la enzima aún no es sustancial.

5.3 ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DEL COLORANTE

Ante la alta susceptibilidad del colorante a las condiciones de incubación, resulta necesario contar con elementos para separar estos efectos que pueden enmascarar estudios cinéticos. Ha sido reportado que la degradación de ciertos carotenos en fase acuosa depende de la concentración del sustrato (8).

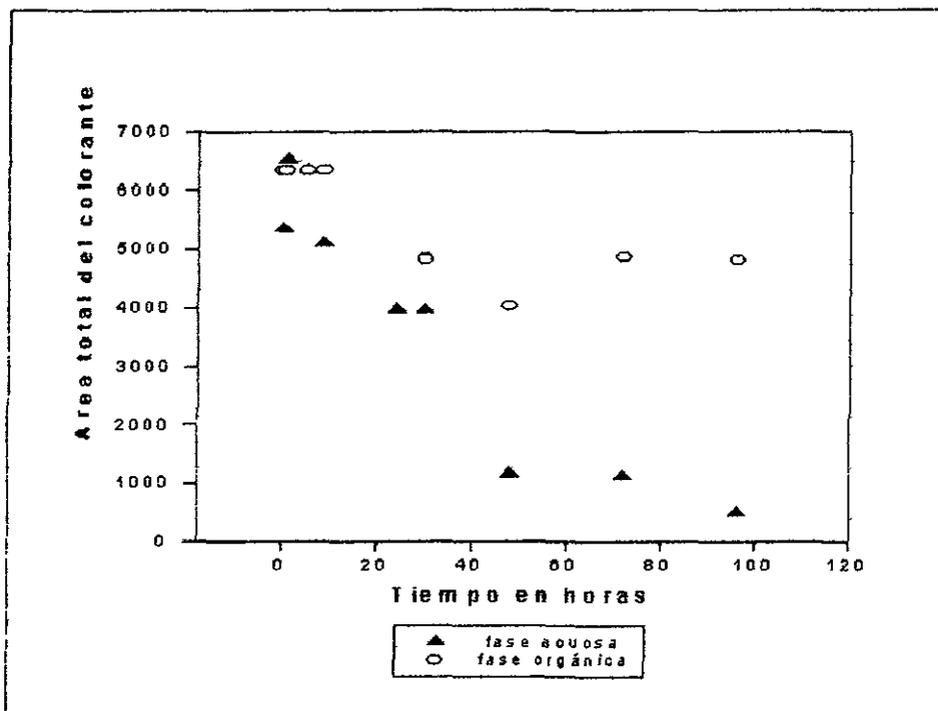


Fig. 17. Degradación del diéster. Comparación de la degradación del diéster en fase acuosa y fase orgánica con enzima inmovilizada en amberlita. Pérdida de color en base al área total del colorante medido por HPLC contra tiempo.

Se puede observar que la pérdida de color en agua es notablemente más intensa que en hexano. En este último caso la señal se estabiliza después de 30 horas, sugiriendo que hay formas lábiles y formas resistentes. En contraparte, la pérdida de señal es total a las 100 horas de incubación en agua.

Se conoce que el oxígeno afecta de manera importante el grado de oxidación y por ende la estabilidad del color. Se llevaron a cabo estudios en presencia y ausencia de oxígeno por 24 horas a 40°C y se observó un 88% de pérdida de absorbancia para el primer caso. Aún en ausencia de oxígeno la pérdida fue de 44%. Es también conocido que la presencia de proteína en el medio acuoso ejerce un efecto estabilizador del colorante (7). Con este fundamento, se llevó a cabo un estudio de degradación en presencia de albúmina como proteína estabilizante. Los resultados obtenidos, combinando el efecto del oxígeno con la proteína, se muestran en la figura 18.

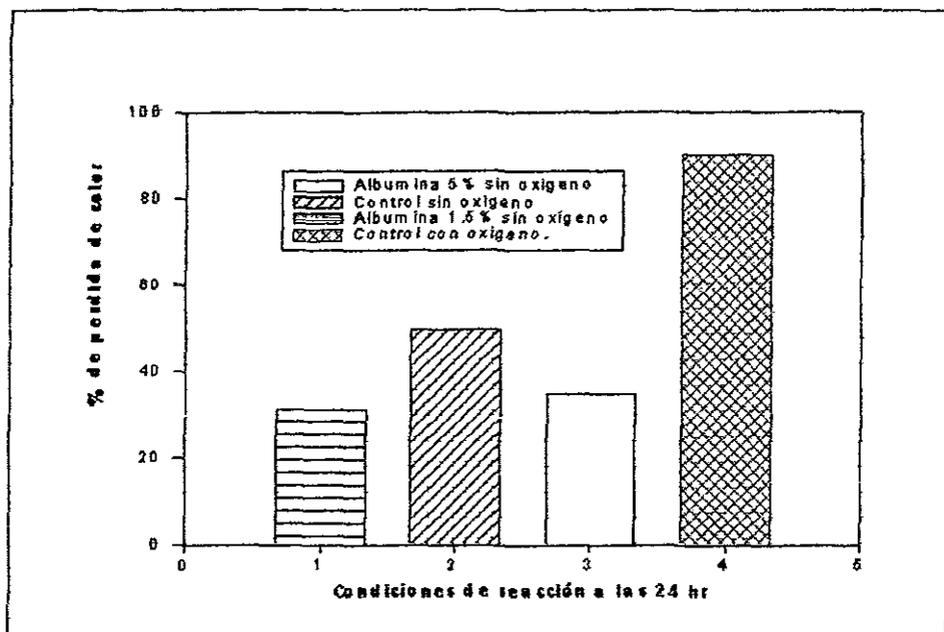


Fig. 18. Efecto de la proteína en la degradación del color. Efecto del oxígeno y la concentración de albúmina en la estabilización del colorante en fase acuosa.

La albúmina a un nivel de 1.5% reduce significativamente la degradación, al bajar la pérdida en ausencia de oxígeno de 50% a un 30%. Es posible por lo tanto que la presencia de enzima en el sistema juegue un papel estabilizador similar. En el presente estudio no se efectuaron ensayos de estabilización por proteínas en medios con oxígeno.

6.1 CONCLUSIONES

La lipasa de *Cándida cylindracea* tiene la capacidad de hidrolizar pigmentos de la flor de cempasúchil en medio orgánico y fase acuosa.

Se logro obtener luteína en fase orgánica con un bajo rendimiento del 2.6 % en comparación con la fase acuosa.

El consumo de diéster a las 24 hr de reacción es del orden de 15 veces mayor en fase acuosa que en fase orgánica.

La máxima formación de luteína se da a las 144hr en fase orgánica, mientras que en fase acuosa se alcanza a las 24 hr.

En fase orgánica, la enzima cambia su especificidad por la formación de monoesteres, con una mayor producción de M2. En fase acuosa la preferencia es por M3.

La degradación del colorante es más evidente en fase acuosa que en fase orgánica.

La albúmina, tienen un efecto positivo en la estabilización del colorante.

Las técnicas analíticas utilizadas en el presente trabajo son adecuadas para conocer el perfil de los productos resultantes en la hidrólisis.

6.2 RECOMENDACIONES PARA MEJORAR LAS CONDICIONES DE REACCIÓN.

Probar otro tipo de lipasa, que sea más estable en medios orgánicos, como sería *Pseudomonas sp* y *Alcaligenes sp*. Se ha comprobado que estas enzimas tienen preferencia por hidrolizar ácidos grasos de cadena larga, así como una adecuada estabilidad en solventes orgánicos [18].

También resulta conveniente medir el contenido de agua cuantitativamente en el sistema de reacción (fase orgánica), para encontrar la cantidad óptima, así como medir el consumo de ésta durante el transcurso de la reacción.

Debido a que no se logró una adecuada reproducibilidad en el sistema de reacción en fase acuosa y fase orgánica, sería conveniente buscar otros métodos de inmovilización, para tener una adecuada absorción de enzima dando un biocatalizador más homogéneo.

Es recomendable que se abra paso a nuevas líneas de investigación en la hidrólisis enzimática de la flor de cempasúchil en medios no convencionales.

Actualmente la información existente es limitada, por lo que se puede considerar que el campo de investigación es sumamente amplio.

CAPITULO VI

6.3 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amado, I.; Gómez, N. " Colorantes Naturales en la Industria Alimenticia ". Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D. F. (1988).
- 2.- García, G. M. " Biotecnología Alimentaria ". Tafoya, A.; García, H. F. Cap 15. Ed. Limusa.
- 3.- Deshpande, U.F.; Salunkhe, D.D.; Deshpande, S.S. " Nutritional and health Aspects and Food Antioxidants. Edit. D.L. Madhosvi and S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe. Editorial Marcel Dekker, 1996 P.p 361-470.
- 4.- Britton, G. " Biosynthesis of Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, vol. 1 Goodwin, T.W. Cap 4. Pp: 225-257 (1976).
- 5.- Dirección en red: <http://Kemin.com/html/lutein.html>
- 6.- Becemil-García, H.J " Evaluación del poder pigmentante de la luteína y Capsantina en pollos de engorda y gallinas de postura con un colorímetro de reflectancia " Tesis de licenciatura, Facultad de Veterinaria UNAM, México, D.F (1988)
- 7.- G. Britton, S. Liaaen-Jensen, Pfander, H. " Carotenoids " Volumen 1: Isolation and Analysis. Editorial Birkhauser Verlag 1995
- 8.- Minguéz-Mosquera, M.; Jaren-Galan, M. " Kinetics of the Decolouring of Carotenoid Pigments ". *J. Sci. Food Agric.*, 67:153-161 (1995)
- 9.- Davis, B.H. *Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol. 2, T.W Goodwin. Cap 19: 38-165 (1976).
- 10.- Philip, T.; Chen, T.S. " Separation and Quantitative Analysis of Some Carotenoid Fatty Acid Esters of Fruits By Liquid Chromatography ". *J. Chromatography*, 435: 113-126 (1988)
- 11.- Yasutoshi-Muto.; Hisataka-Moriwaki. " Acyclic retinoids and cancer chemoprevention ". *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 63, No. 1, pp. 157-160 (1991).

12.- Khachik, F.; Beecher, G.R.; Smith, J.C. "Lutein, Lycopene, and their oxidative metabolites in Chemoprevention of Cancer". *J. Cell. Biochem. Supplement* 22:236-246 (1995).

13.- Philip, T.; Berry, J. W. "A Process For The Purification of Lutein-Fatty Acid Esters From Marigold Petals) " *J. Food.Sci.* Vol 40:163-164 (1975).

14.- Delgado vargas, F.I.; Paredes López, O. " Effects of enzymatic treatment and carotenoid extraction from Marigold flowers " (*Tagetes erecta*). *Food Chem* 58:3 P.p 255-258.

15.- Matzuno, T. " Structure and Characterization of Carotenoids from Various Habitats and Natural Sources. *Methods in Enzymology*, 213: 22-31, (1992).

16.- Asociación Nacional de la Industria Química, A. C., Anuario Estadístico de la Industria Química Mexicana en 1986, ANIQ., A.C., México, p.385.

17.- Cuervo-Coss, R. " Obtención de Enzimas Lipolíticas de *Penicillium Caseicolum* en Fermentación Sumergida " Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F. (1995).

18.- Mukherjee, K. D. " Lipase -catalyzed Reactions For Modification of Fats and Other Lipids " *Biocatalysis*, vol.3, pp. 227-293 (1990).

19.- Kang, S. T. ; Rhee, J.S. " Characteristic of Immobilized Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive oil of High Concentration in Reverse Phase System". *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1469-1476 (1989).

20.- Han, D.; Rhee, J. S " Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reverse micelles ". *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1250-1255 (1986).

21.- Han, D.; Rhee, J.S " Batchwise hydrolysis of olive oil by lipase in AOT-isooctane reverse micelles ". *Biotechnol Lett.* 7: 651-656 (1985).

22.- Halling, P.J. " Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis " . *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 178-206. (1994).

23.- Klibanov, A. M " Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents". *Trends Biochem.Sci.*, 14, 141-144 (1989).

- 24.- Mukataka,S.; Kobayashi, T.; Sato,S.; Takahashi,J. " Enzymatic hidrolysis of fats at high substrate concentrations in biphasic organic aqueous systems ". *J.Ferment. Technol.*, 65: 23-29 (1987).
- 25.- Gorman, L.A.S.; Dorkick " Organic solvents Strip water off Enzymes " *Biotechnology.Bioeng.* vol 39: 392-397 (1992).
- 26.- Koskinen, A.M.P.; Klibanov, A.M. " Enzymatic Reactions in Organic Media " . Yang, Z.;Russell A. J. Cap-3. Pp: 43-65 (1996).
- 27.- Dastoli,E.R.; Price,S. " Catalysis by xanthine oxidase suspended in organic media ". *Biochem.Biophys* 118:163-165 (1967).
- 28.-Mungía,L.A.; Quintero,R.R. " Tecnología enzimática aplicaciones en alimentos y medicina (compilación). "Universidad Nacional Autonoma de México.
- 29.- Neal F.;Craft. " Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and β -carotene ".*J.Agric.Food Chem* 40:431-434 (1992).
- 30.- Official Methods of Analysis. Association of official analytical chemists: " Vitamins and other Nutrients". 15th edition Cap 45. Pp 1048-1049 (1990).