



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA QUÍMICA - BIOCATALISIS

EFFECTO DEL AGUA SOBRE REACCIONES ENZIMÁTICAS  
EN FLUIDOS COMPRIMIDOS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
MIGUEL ÁNGEL PIMENTEL ALARCÓN

TUTOR PRINCIPAL  
EDUARDO BÁRZANA GARCÍA, FQ UNAM  
COMITÉ TUTOR  
FERNANDO BARRAGÁN AROCHE, FQ UNAM  
MIQUEL GIMENO SECO, FQ UNAM

MÉXICO, CDMX, MARZO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: Dr. Gracia Fadrique Jesús

Secretario: Dra. Montiel Pacheco Carmina

1er. Vocal: Dr. Tecante Coronel Alberto

2do. Vocal: Dr. Zanella Specia Rodolfo

3er. Vocal: Dr. Bárzana García Eduardo

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio E-314, Facultad de Química, UNAM

### **TUTOR DE TESIS:**

Dr. Bárzana García Eduardo

---

**FIRMA**

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de doctorado otorgada para el presente proyecto de investigación (CVU/Becario: 419774/262887).

A todas las personas que contribuyeron en mayor o menor medida a la realización de este proyecto, que son demasiadas como para mencionarlas una por una.

## Resumen

Una de las principales metas de las ciencias químicas es desarrollar tecnologías sostenibles para resolver problemas globales relacionados con la energía, el medio ambiente y los recursos naturales. Dos de los mayores problemas de la industria química son los altos niveles de consumo energético y la generación de residuos tales como disolventes orgánicos y metales tóxicos. Una manera de reducirlos es sustituyendo los catalizadores inorgánicos por enzimáticos y los medios de reacción por fluidos comprimidos; no obstante, el comportamiento de estos sistemas aún no está completamente comprendido. El presente trabajo se enfoca en el estudio de la cinética enzimática en fluidos comprimidos como función del contenido de agua, puesto que el agua es el disolvente natural de las enzimas. Sin embargo, el estudio de estos sistemas requiere equipo especializado que permita realizar mediciones a alta presión sin necesidad de tomar muestras materiales.

Durante este proyecto se diseñó y construyó una celda de transmisión de alta presión para realizar mediciones de cinética enzimática en fluidos comprimidos dentro de un espectrofotómetro convencional. Con la celda, la cinética enzimática de la hidrólisis de estearato de vinilo catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada se analizó como función del contenido de agua en sistemas con dos fluidos comprimidos: dióxido de carbono en estado supercrítico y norflurano en estado líquido. Se encontró que, para el caso del norflurano, al tratarse de una reacción de hidrólisis, un aumento en el contenido de agua resulta en un incremento en la rapidez de reacción; por otro lado, para el caso del dióxido de carbono se observa el efecto opuesto; este comportamiento anómalo se puede explicar por la naturaleza hidrofóbica de este fluido, que ocasiona que las moléculas de agua migren hacia la superficie del catalizador, bloqueando así el acceso para las moléculas del estearato de vinilo.

En conclusión, se determinó que el efecto del agua sobre esta reacción enzimática en fluidos comprimidos depende de la polaridad del fluido en cuestión. No obstante, se requiere de experimentación adicional con diferentes enzimas, sustratos y fluidos comprimidos para comprender mejor la naturaleza de estos fenómenos.

## Abstract

Currently, one of the main goals of chemistry is to develop sustainable technologies which provide solutions to global problems related to energy, environment and natural resources. Two of the main problems of chemical industry are the high levels of energy consumption and the generation of residues such as organic solvents and toxic metals. One way of reducing them is by substituting inorganic catalysts for enzymatic ones and reaction media for compressed fluids; however, the behavior of such systems is not yet fully understood. This work is focused on studying enzymatic kinetics in compressed fluids as a function of water content, since water is the native medium of enzymes. However, in order to study systems with compressed fluids, special equipment is required, which allows measurements under high pressure without the need of material sampling.

A high pressure transmission cell was designed and constructed to make kinetic measurements of enzymatic reactions in compressed fluids inside a conventional spectrophotometer. Also, by means of this cell, the enzymatic kinetics of the hydrolysis of vinyl stearate catalyzed by immobilized lipase B from *Candida antarctica* was analyzed as a function of water content inside two different compressed fluids: supercritical carbon dioxide and liquid norflurane. It was found that, for the case of norflurane, as expected in a hydrolysis reaction, an increase in the water content results in a higher reaction rate. However, in carbon dioxide the opposite effect is observed; this anomalous behavior could be explained by the hydrophobic nature of the medium, which causes water molecules to migrate to the catalyst surface, thus blocking the access for the vinyl stearate molecules.

In conclusion, it was found that the effect of water on this enzymatic reaction in compressed fluids highly depends on the polarity of the fluid. However, further experiments are required with different enzymes, substrates and compressed fluids in order to better understand the nature of this phenomena.

# Índice general

Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Justificación . . . . .	1
1.2. Problema . . . . .	1
1.3. Hipótesis . . . . .	2
1.4. Objetivos . . . . .	2
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
2.1. Fluidos comprimidos . . . . .	3
2.1.1. Fluidos supercríticos . . . . .	4
2.2. Enzimas . . . . .	4
2.2.1. Hidrolasas, esterasas y lipasas . . . . .	4
2.3. Actividad de agua . . . . .	5
2.4. Espectrofotometría . . . . .	5
<b>3. Antecedentes</b>	<b>7</b>
3.1. Fluidos comprimidos . . . . .	7
3.1.1. Celdas de transmisión . . . . .	8
3.2. Enzimas en medios no acuosos . . . . .	8
3.2.1. Enzimas en medios orgánicos . . . . .	8
3.2.2. Enzimas en fluidos comprimidos . . . . .	10

<b>4. Metodología</b>	<b>12</b>
4.1. Materiales . . . . .	12
4.2. Celda de transmisión de alta presión . . . . .	12
4.3. Reacción modelo . . . . .	13
4.4. Equilibrio de humedad . . . . .	14
4.5. Pruebas preliminares . . . . .	15
4.5.1. Condiciones de operación . . . . .	15
4.5.2. Curvas de calibración . . . . .	15
4.5.3. Pruebas de control . . . . .	15
4.6. Mediciones cinéticas . . . . .	16
4.7. Análisis estadístico . . . . .	17
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
5.1. Celda de transmisión de alta presión . . . . .	19
5.2. Cinética enzimática . . . . .	19
5.2.1. Modelo cinético . . . . .	21
5.2.2. Ajuste y simplificación del modelo . . . . .	23
5.2.3. Rapidez de reacción . . . . .	31
5.3. Efecto del agua . . . . .	31
5.3.1. Rapidez de reacción . . . . .	31
5.3.2. Equilibrio termodinámico . . . . .	32
<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>38</b>



# Índice de figuras

2.1. Fluidos comprimidos . . . . .	3
3.1. Memoria molecular enzimática en medios orgánicos . . . . .	9
4.1. Diagrama de la celda de transmisión de alta presión . . . . .	14
4.2. Hidrólisis de estearato de vinilo catalizada por CALB. . . . .	14
4.3. Curvas de calibración para VS . . . . .	17
5.1. Diagrama de construcción de la celda de transmisión . . . . .	20
5.2. Fotografías de la celda de transmisión de alta presión . . . . .	21
5.3. Curva cinética típica . . . . .	22
5.4. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con LiCl ( $a_w = 0.113$ ) . . . . .	25
5.5. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con MgCl <sub>2</sub> ( $a_w = 0.321$ ) . . . . .	25
5.6. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $a_w = 0.432$ ) . . . . .	26
5.7. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con NaBr ( $a_w = 0.546$ ) . . . . .	26
5.8. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con NaCl ( $a_w = 0.749$ ) . . . . .	27
5.9. Curva cinética en sCO <sub>2</sub> con K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $a_w = 0.967$ ) . . . . .	27
5.10. Curva cinética en R-134a con LiCl ( $a_w = 0.113$ ) . . . . .	28
5.11. Curva cinética en R-134a con MgCl <sub>2</sub> ( $a_w = 0.321$ ) . . . . .	28
5.12. Curva cinética en R-134a con K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $a_w = 0.432$ ) . . . . .	29
5.13. Curva cinética en R-134a con NaBr ( $a_w = 0.546$ ) . . . . .	29
5.14. Curva cinética en R-134a con NaCl ( $a_w = 0.749$ ) . . . . .	30
5.15. Curva cinética en R-134a con K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $a_w = 0.967$ ) . . . . .	30
5.16. Efecto del agua sobre la constante cinética . . . . .	32
5.17. Modelo esquemático de inhibición por agua . . . . .	33
5.18. Efecto del FC sobre la constante aparente de equilibrio . . . . .	35

# Índice de tablas

3.1. Propiedades de CO <sub>2</sub> y R-134a . . . . .	8
3.2. Reacciones enzimáticas en medios orgánicos . . . . .	10
3.3. Reacciones enzimáticas en sCO <sub>2</sub> . . . . .	11
4.1. Actividad de agua de sales saturadas . . . . .	15
4.2. Condiciones de operación para mediciones UV . . . . .	16

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Justificación

En la actualidad, uno de los principales retos de la química es desarrollar tecnologías sustentables para resolver problemas relacionados con la energía, el cambio climático, mantenimiento de recursos naturales y protección del medio ambiente. Para esto es necesario minimizar el consumo energético, así como la generación de residuos y el uso de sustancias peligrosas y recursos no renovables.<sup>(1)</sup>

Los disolventes orgánicos representan uno de los principales residuos de la industria química, y es bien sabido que tienen efectos negativos tanto para la salud como para el medio ambiente.<sup>(2)</sup> Por otro lado, el diseño de tecnologías sustentables requerirá cambiar los procesos de síntesis, reduciendo el gasto energético y utilizando catalizadores más selectivos que no contengan metales tóxicos.<sup>(3)</sup>

Debido a lo anterior, el uso simultáneo de enzimas y fluidos comprimidos para sustituir catalizadores inorgánicos y disolventes orgánicos, respectivamente, podría representar un avance importante hacia una química sustentable.

### 1.2. Problema

Las reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos ofrecen una alternativa a los procesos químicos convencionales; sin embargo, se requiere conocer con más detalle el comportamiento de las enzimas en estos fluidos, particularmente como función de

la disponibilidad de agua en el sistema.

### **1.3. Hipótesis**

El comportamiento catalítico de una enzima en un fluido comprimido depende en gran medida de la cantidad de agua disponible en el medio; y una manera de medir *in situ* este comportamiento es mediante de una celda de transmisión que soporte la presión del fluido comprimido.

### **1.4. Objetivos**

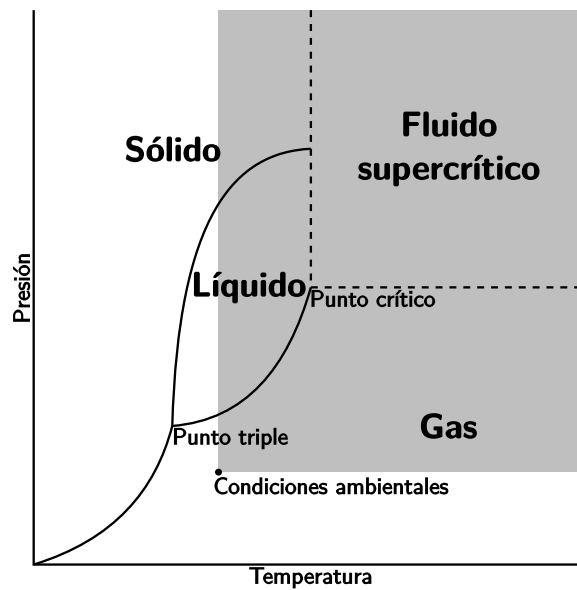
- Diseñar y construir una celda de transmisión que soporte presiones mayores a 10 MPa, y probarla dentro de un espectrofotómetro comercial estándar para mediciones *in situ* de cinética enzimática en fluidos comprimidos.
- Utilizando la celda construida, determinar el efecto del contenido de agua sobre los parámetros cinéticos de una reacción enzimática en dos fluidos comprimidos, para conocer y posteriormente predecir el comportamiento enzimático en este tipo de sistemas.

# Capítulo 2

## Marco teórico

### 2.1. Fluidos comprimidos (FCs)

Se les da este nombre a los compuestos que se encuentran en estado gaseoso a presión atmosférica y temperatura ambiente, pero se comprimen hasta alcanzar el estado líquido o supercrítico (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Diagrama de fases de un fluido comprimido (color gris).

### 2.1.1. Fluidos supercríticos (FSCs)

Una vez que se supera el punto crítico de una sustancia (Figura 2.1) la distinción entre las fases líquida y gaseosa desaparece y se forma una sola fase supercrítica, con propiedades fisicoquímicas diferentes a las de un líquido o un gas. En términos generales, un FSC puede disolver materiales como los líquidos y difundirse a través de los sólidos como los gases, pues presenta densidad similar a los líquidos pero viscosidad y difusividad más similares a los gases.

Los fluidos comprimidos tienen una amplia gama de aplicaciones, como son extracción, lavado en seco, refrigeración, como propelente, disolvente, entre otros. Como medio de reacción, se pueden elegir fluidos con propiedades de solvatación similares a las de los medios orgánicos, con la gran ventaja de que pueden ser removidos de un sistema simplemente liberando la presión, lo que elimina costosos procesos de eliminación de disolvente. Por esta razón, hay un creciente interés en su estudio para aplicaciones como reacciones enzimáticas, producción de biocombustibles, fraccionamiento químico, entre otras.<sup>(4-7)</sup>

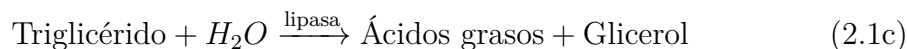
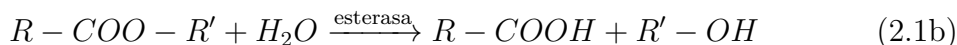
## 2.2. Enzimas

Las enzimas son macromoléculas especializadas, en su gran mayoría proteínas, cuya función es catalizar reacciones químicas en los seres vivos. Su poder catalítico es a menudo mucho mayor que el de catalizadores sintéticos o inorgánicos, y a diferencia de éstos, no contienen metales tóxicos, cuentan con alto grado de especificidad por sus sustratos y son capaces de funcionar en condiciones suaves de temperatura ( $< 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), presión ( $< 10\text{ MPa}$ ) y pH (generalmente entre 4 y 8).

### 2.2.1. Hidrolasas, esterasas y lipasas

Las hidrolasas representan uno de los tipos más importantes de enzimas, son aquellas que catalizan la hidrólisis de un enlace químico (Ecuación 2.1a); Dentro de este grupo de enzimas, se encuentran las esterasas, que hidrolizan ésteres en ácidos y alcoholes (Ecuación 2.1b); y uno de los principales tipos de esterasas son las lipasas, que actúan sobre lípidos, por ejemplo, la hidrólisis de triglicéridos en ácidos gra-

tos y glicerol (Ecuación 2.1c). Las lipasas se estudian extensamente para numerosas aplicaciones industriales y farmacéuticas.



En comparación con otro tipo de enzimas, las lipasas tienen mayor interacción con moléculas hidrofóbicas, como son sus sustratos y productos; por esta razón, son más resistentes a la presencia de medios no acuosos. Asimismo, a pesar de que la actividad nativa de las lipasas es la hidrólisis, si se utilizan medios de reacción no polares, se puede invertir su actividad para catalizar la reacción inversa,<sup>(8)</sup> lo que incrementa su interés para fines sintéticos y biotecnológicos.

### 2.3. Actividad de agua ( $a_w$ )

En términos generales, la actividad de agua es una medida de la humedad de equilibrio de un sistema. Se define como la presión de vapor del sistema dividida entre la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura (Ecuación 2.2). Es un parámetro ampliamente utilizado para determinar la capacidad de conservación, proliferación microbiana y actividad enzimática de un sistema.

$$a_w = p_w / p_w^* \quad (2.2)$$

$p_w$  : presión de vapor de agua del sistema

$p_w^*$  : presión de vapor de agua pura a la misma temperatura

### 2.4. Espectrofotometría

Es un método cuantitativo de medición de las propiedades de reflexión o transmisión de un material, dependiendo de la longitud de onda. Se refiere específicamente al intervalo del espectro electromagnético que comprende el ultravioleta medio, visible e infrarrojo cercano (180 nm a 1  $\mu\text{m}$ ).

En química se utiliza para determinar la cantidad de una sustancia en un sistema, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de él y basándose en la ley de Beer-Lambert (Ecuación 2.3). El sistema absorbe parte de la radiación incidente, transmitiendo un haz de menor energía. La cantidad de luz absorbida está en función de la longitud de onda utilizada, y depende de la estructura de las moléculas, por lo que es característica de cada sustancia química.

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \quad (2.3)$$

$A$  : Absorbancia medida en el sistema

$\epsilon$  : Absortividad molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

$d$  : Distancia recorrida por la radiación ( $cm$ )

$c$  : Concentración de la especie analizada ( $M$ )

Debido a su simplicidad y bajo costo, los métodos espectrofotométricos se usan ampliamente para análisis cualitativos y cuantitativos: de ADN, proteínas, pigmentos, compuestos aromáticos, reacciones enzimáticas, entre otros. Otra de sus ventajas importantes es que no implica pérdida o adición de material, por lo que es posible analizar sistemas cerrados.



# Capítulo 3

## Antecedentes

### 3.1. Fluidos comprimidos

Dentro de los FCs, el dióxido de carbono supercrítico ( $\text{sCO}_2$ ) es de los más utilizados debido a sus numerosas ventajas:<sup>(9)</sup>

- Punto crítico moderado ( $T_c = 31.1 \text{ °C}$ ,  $P_c = 7.39 \text{ MPa}$ )
- No inflamable
- No tóxico
- Bajo costo
- Sin residuo líquido
- Alto coeficiente de difusión
- Poder de solvatación modificable (cambiando temperatura o presión)
- Gran efectividad para disolver compuestos no polares

Por otro lado, para aplicaciones que requieren disolventes más polares, se estudian otro tipo de FCs, tales como los refrigerantes.<sup>(10-12)</sup> Uno de los más utilizados es el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a o norflurano), un fluido comprimido a líquido ampliamente empleado como propelente además de refrigerante.<sup>(12)</sup>

Las propiedades físicas de los dos FCs utilizados en el presente trabajo ( $\text{sCO}_2$  y R-134a líquido) se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Propiedades físicas de los FCs utilizados en el presente trabajo.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>R-134a</b>
<b>Punto crítico</b>		
Presión (kPa)	7377	4056
Temperatura (°C)	30.98	101.03
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	467.6	508
Momento dipolar <sup>(13)</sup>	0	2.06
<b>Punto triple</b>		
Presión (kPa)	518	0.39
Temperatura (°C)	-56.56	-103.3

### 3.1.1. Celdas de transmisión

Uno de los principales retos al estudiar sistemas con FCs consiste en hacer mediciones directas en el sistema cerrado para evitar pérdidas de presión. Una manera de hacerlo es mediante técnicas espectrofotométricas; no obstante, para realizar estas mediciones en FCs es necesario contar con espectrofotómetros especializados de alta presión,<sup>(14)</sup> o bien introducir el sistema en una celda de transmisión cuyos componentes, incluyendo las piezas ópticas, cumplan los siguientes requerimientos: no absorber en el intervalo de frecuencias de interés, ser resistentes a agentes químicos y tener propiedades físicas que les permitan resistir temperatura y presión.

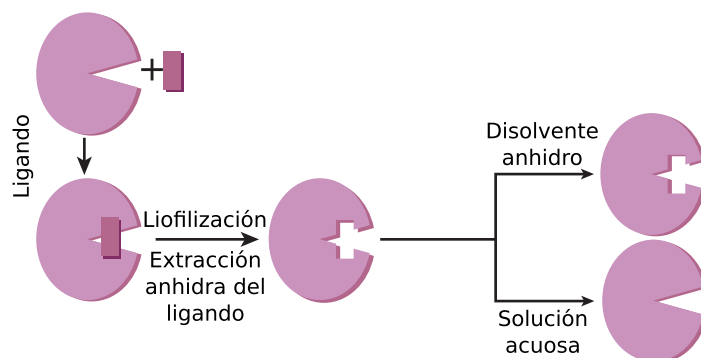
## 3.2. Enzimas en medios no acuosos

### 3.2.1. Enzimas en medios orgánicos

Aunque el medio natural de muchas enzimas es el agua, también se han usado y estudiado en otro tipo de disolventes. La presencia de medios orgánicos, sobre todo compuestos polares, puede desnaturalizar e inactivar algunas enzimas. Debido a lo anterior, se buscan maneras de prevenir esta inactivación, como son inmovilizar a la enzima o utilizar disolventes no polares, que tienen menor tendencia a retirar las

moléculas de agua de la superficie de las enzimas.<sup>(15)</sup>

Típicamente las enzimas presentan menor actividad en medios orgánicos que en agua, principalmente por factores como solubilidad y cambios estructurales;<sup>(16)</sup> aunque por otro lado, se ha reportado que estos medios, principalmente los no polares, ofrecen diferentes ventajas como son estabilidad incrementada, disolución de compuestos hidrofóbicos, catálisis de reacción inversa y memoria molecular (Figura 3.1).<sup>(17-19)</sup>



**Figura 3.1:** Memoria molecular debido a la rigidez enzimática en medios orgánicos<sup>(18)</sup>

Como todas las biomoléculas, las enzimas requieren cierta cantidad de moléculas de agua sobre su superficie, lo que modula su estabilidad, movilidad conformacional y actividad catalítica.<sup>(20)</sup> Por lo anterior, la mayoría de los estudios en medio no acuoso se realizan manteniendo constante la cantidad de agua disponible para la enzima; una manera de lograr esto es equilibrando el sistema completo con una disolución saturada de una sal con actividad de agua conocida.<sup>(21,22)</sup>

En cuanto al tipo de enzimas, por lo regular las esterasas, y particularmente las lipasas, son más tolerantes a disolventes orgánicos, ya que sus sustratos y productos son moléculas hidrofóbicas. Adicionalmente, un medio no polar les permite invertir el equilibrio termodinámico hacia síntesis de ésteres en lugar de hidrólisis. Debido a lo anterior, las lipasas son las enzimas más utilizadas en medios orgánicos;<sup>(15,23)</sup> no obstante, como se muestra en la Tabla 3.2, existen estudios con diferentes tipos de enzimas en presencia de diversos medios orgánicos.

**Tabla 3.2:** Ejemplos de reacciones enzimáticas en presencia de medios orgánicos.

Enzima	Organismo	Reacción	Medios
Lipasa	<i>Candida antarctica</i>	Síntesis de poliésteres	Tolueno, heptano* <sup>(23)</sup>
Proteasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hidrólisis de proteínas	Ciclohexano, xileno* <sup>(24)</sup>
Deshidrogenasa	<i>Haloferax volcanii</i>	Oxidación de alcoholes	Acetonitrilo, metanol* <sup>(25)</sup>
Amilasa	<i>Nesterenkonia</i> sp.	Hidrólisis de almidón	Benceno, cloroformo* <sup>(26)</sup>
Oxidasa	<i>Chromobacterium</i> sp.	Oxidación de colesterol	Hexano, dietiléter* <sup>(27)</sup>
Tirosinasa	<i>Streptomyces</i> sp.	Oxidación de aromáticos	Metanol, etanol* <sup>(28)</sup>
Fosforilasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Fosforólisis	Dimetilformamida, urea* <sup>(29)</sup>

\* Entre otros

### 3.2.2. Enzimas en fluidos comprimidos

Dadas las ventajas que ofrecen los FCs, existe un creciente interés en su uso como medio para reacciones enzimáticas; no obstante, en estos sistemas existen numerosos factores que pueden desestabilizar o inactivar a las enzimas, como son: temperatura, presión, naturaleza del fluido, actividad de agua, pasos de presurización y despresurización, entre otros.<sup>(5)</sup> Se han reportado estudios principalmente con lipasas en sCO<sub>2</sub>,<sup>(30–32)</sup> y en menor medida con otros tipos de enzimas (Tabla 3.3), sin embargo se espera un desarrollo cada vez más extenso.<sup>(5,6)</sup>

**Tabla 3.3:** Ejemplos de reacciones enzimáticas en sCO<sub>2</sub><sup>(6)</sup>

<b>Enzima</b>	<b>Reacción</b>
Lipasa de <i>Mucor miehei</i>	Amidación
Células de <i>Bacillus megaterium</i> PYR2910	Carboxilación
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	Esterificación
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	Acetilación
Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	Esterificación
Cutinasa de <i>Fusarium solani pisi</i>	Transesterificación
Lipasa de páncreas porcino	Esterificación
Novozym 435	Esterificación
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	Transesterificación
Novozym 435	Esterificación
Sucrosa fosforilasa de <i>Bifidobacterium longum</i>	Transglicosilación
Novozym 435	Esterificación
Alcohol deshidrogenasa de <i>Geotrichum candidum</i>	Reducción

# Capítulo 4

## Metodología

### 4.1. Materiales

Todos las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro GENESYS™ 10S (Thermo Scientific™, USA). Se utilizaron dos fluidos comprimidos: CO<sub>2</sub> con grado de pureza de 99.5 % (INFRA® , México) y R-134a con pureza de 98 % (DuPont™ Suva® , USA); el estearato de vinilo (VS) y todas las sales (ver Tabla 4.1) se adquirieron de Sigma-Aldrich® , USA; y como catalizador enzimático se utilizó Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada (c-LEcta® , Alemania).

### 4.2. Celda de transmisión de alta presión

Para trabajar con fluidos comprimidos se requieren equipos, particularmente celdas de transmisión, diseñados especialmente para tal efecto. Es necesario que todos los componentes de la celda presenten alta resistencia física y química; y de manera adicional, las piezas ópticas requieren ser transparentes en las longitudes de onda deseadas. En el presente proyecto se diseñó una celda de transmisión de alta presión (Figura 4.1), la cual se describe a continuación:

**Cuerpo principal (Figura 4.1A):** Se diseñó con dimensiones que le permitan a la celda introducirse por completo en el espectrofotómetro utilizado; consiste en un cilindro hueco con un barreno hacia el interior (Figura 4.1E) que permite la conexión con una válvula para cargar y descargar las sustancias gaseosas. Se

construyó en acero inoxidable grado 316 debido a su alta resistencia a corrosión y ataques químicos.

**Ventanas ópticas (Figura 4.1B):** Son los componentes más delicados de las celdas, pues deben ser transparentes además de resistentes. Se pueden utilizar diferentes materiales dependiendo de la longitud de onda a medir, éstos incluyen diamante, zafiro, fluoruro de calcio, germanio, silicón, sulfuro de zinc, selenuro de zinc, entre otros.<sup>(33)</sup> Para los propósitos de este proyecto, se eligieron piezas cilíndricas de zafiro (Rubicon Technology<sup>TM</sup>, USA) puesto que ofrecen un buen compromiso entre resistencia, transparencia y costo.

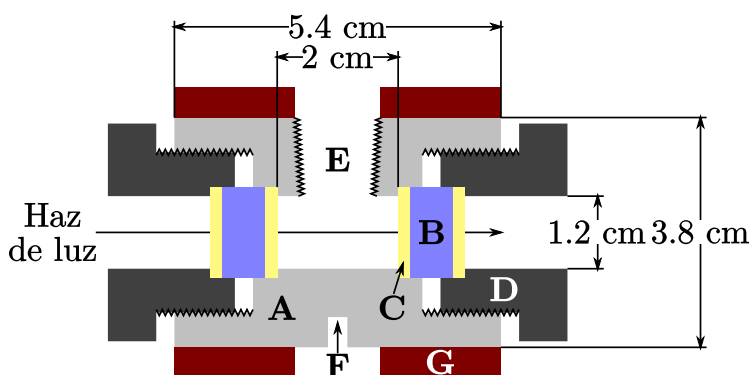
**Juntas de sellado (Figura 4.1C):** Debido a las imperfecciones en la superficie de las piezas rígidas, se requieren juntas para garantizar un cerrado hermético y prevenir pérdidas de presión durante las mediciones. Para este efecto, se diseñaron juntas anulares y se construyeron en politetrafluoroetileno (PTFE), debido a su elevada resistencia física y química.

**Tapas (Figura 4.1D):** De igual manera que el cuerpo principal, se construyeron en acero inoxidable grado 316. Su función es, mediante roscado recto, mantener la celda cerrada herméticamente durante el tiempo necesario para realizar las mediciones espectrofotométricas.

**Control térmico:** Se requiere para garantizar que las mediciones se lleven a cabo a temperatura constante. El mecanismo de control consta de un termopozo en el cuerpo principal de la celda (Figura 4.1F) y dos chaquetas cilíndricas de calentamiento por resistencia eléctrica (Figura 4.1G); todo esto acoplado a un controlador automático externo.

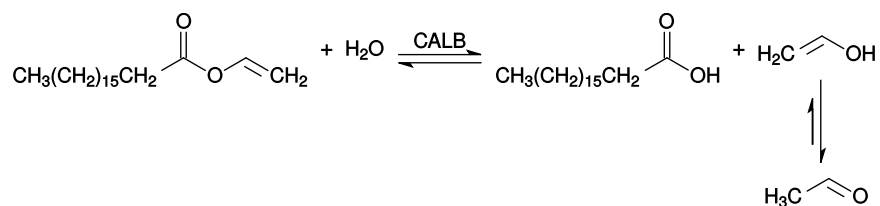
### 4.3. Reacción modelo

Los ésteres vinílicos presentan absorbancia de radiación ultravioleta, alrededor de los 200 nm;<sup>(34)</sup> por lo que se puede seguir una reacción de hidrólisis catalizada por esterasa. Debido a su gran estabilidad y resistencia a medios no acuosos, se seleccionó



**Figura 4.1:** Corte longitudinal de la celda de transmisión de alta presión. A) Cuerpo principal. B) Ventana óptica. C) Junta de sellado. D) Tapa. E) Entrada/salida de gases. F) Termopozo. G) Chaqueta de calentamiento.

CALB inmovilizada como catalizador enzimático, y se eligió estearato de vinilo como sustrato modelo (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Hidrólisis de estearato de vinilo catalizada por CALB.

## 4.4. Equilibrio de humedad

Previo a cada medición espectrofotométrica, se colocaron por separado los componentes del sistema; celda de transmisión, enzima y sustrato; dentro de un desecador con la disolución saturada de la sal seleccionada, se selló al vacío y se dejó equilibrar a temperatura ambiente por un periodo de al menos 24 h. Adicionalmente, un volumen de 3 μL de la misma disolución saturada de sal se introdujo en la celda para mantener constante la actividad de agua a lo largo de la reacción. Una vez equilibrado, se abrió el desecador, se colocaron los componentes faltantes dentro de la celda y se selló herméticamente; este procedimiento no debe tomar más de 15 s, para minimizar la exposición del sistema a la humedad ambiental. La Tabla 4.1 muestra las sales



utilizadas, así como su valor de actividad de agua de equilibrio.

**Tabla 4.1:**  $a_w$  de equilibrio a 35 °C<sup>(35)</sup> de las sales saturadas utilizadas

Sal	$a_w$ (35 °C)
<i>LiCl</i>	0.113
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0.321
<i>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i>	0.432
<i>NaBr</i>	0.546
<i>NaCl</i>	0.749
<i>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	0.967

## 4.5. Pruebas preliminares

### 4.5.1. Condiciones de operación

Para cada FC se hicieron pruebas variando las concentraciones tanto de enzima como de sustrato, y se realizaron barridos de absorbancia de 200 a 400 nm. Las condiciones seleccionadas se muestran en la Tabla 4.2.

### 4.5.2. Curvas de calibración

Después de seleccionar la longitud de onda para cada FC, se hicieron mediciones de absorbancia a concentraciones conocidas y se trazaron las curvas de calibración para convertir mediciones de absorbancia en datos de concentración. Como se observa en la Figura 4.3, en ambos fluidos se presenta una tendencia lineal de absorbancia contra concentración, así como una absorbancia residual, que corresponde a la luz absorbida por las ventanas de la celda y el fluido en cuestión.

### 4.5.3. Pruebas de control

Se realizaron experimentos similares a los mostrados en la Sección 4.6, con las variaciones que se indican a continuación:

**Tabla 4.2:** Condiciones de operación para mediciones UV

	<b>CO2</b>	<b>R-134a</b>
<b>Fase</b>	Supercrítica	Líquido saturado
<b><math>E_T</math> (mg)</b>	1.6	4.0
<b><math>S_0</math> (<math>\mu</math>M)</b>	200	500
<b>T (<math>^{\circ}</math>C)</b>	35	35
<b><math>P_0</math> (MPa)</b>	6.0	0.6
<b>P (MPa)</b>	8.5	0.89
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	210	220

$E_T$ : Catalizador enzimático (incluyendo soporte)

$S_0$ : Concentración inicial de sustrato en la celda

T: Temperatura de reacción

$P_0$ : Presión dentro de la celda antes de calentar

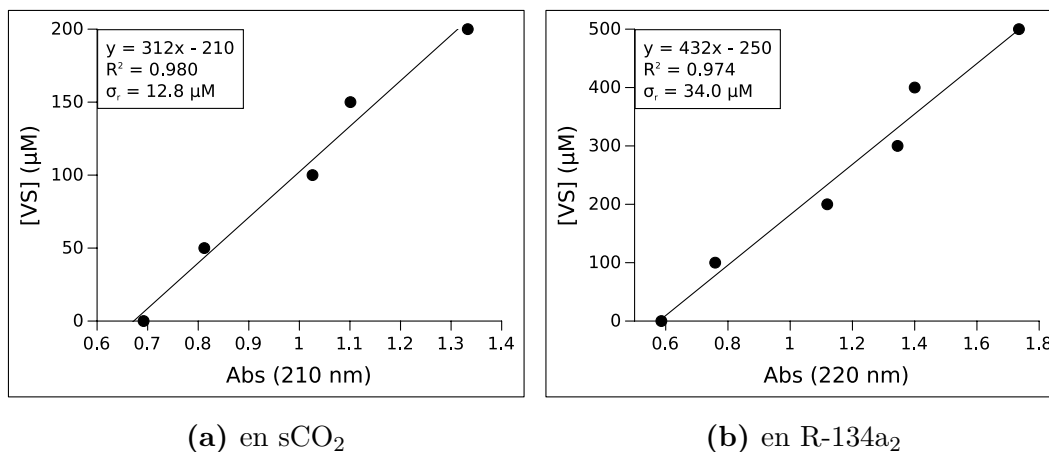
P: Presión dentro de la celda después de calentar

$\lambda$ : Longitud de onda de medición

- Se llevaron a cabo pruebas sin VS para asegurar que el es la única especie que absorbe de manera apreciable en esa longitud de onda.
- Se realizaron pruebas sin enzima para asegurar que no existe hidrólisis no catalizada.
- Se sometió el catalizador enzimático a esterilización por calor húmedo previo a las mediciones cinéticas; para asegurar que no existe actividad catalítica o adsorción de VS en el soporte del catalizador.

## 4.6. Mediciones cinéticas

Debido a las pequeñas cantidades necesarias, se preparó una disolución 16 mM de VS en hexano, la cual se utilizó para cargar el sustrato dentro de la celda; el hexano se removió mediante una campana de extracción. Se colocaron por separado 3  $\mu$ L de disolución saturada de sal dentro de la celda, y ésta se introdujo en el desecador para equilibrar la humedad (Sección 4.4). La enzima se pesó y se colocó aparte dentro del



**Figura 4.3:** Curvas de calibración para VS

dsecador.

Una vez equilibrado el sistema, se abrió el desecador y se introdujo la enzima en la celda, que se selló inmediatamente. Posteriormente se cargó el FC por medio de una bomba tipo jeringa (ISCO<sup>®</sup>, USA) hasta alcanzar la presión inicial ( $P_0$ ); se cerró la válvula y se elevó la temperatura mediante el control térmico automático, lo cual presuriza simultáneamente el sistema hasta la presión de reacción ( $P$ ). Se iniciaron las mediciones en el espectro ultravioleta cuando la temperatura alcanzó 35 °C. Para el caso del R-134a, la celda se agitó manualmente entre mediciones para reducir las limitaciones de difusión.

Todas las mediciones cinéticas se efectuaron al menos por duplicado.

## 4.7. Análisis estadístico

Para cada ajuste o regresión de datos, se utilizó como parámetro estadístico el error estándar (Ecuación 4.1), ya que muestra la correlación que existe entre la regresión y los valores medidos en las mismas unidades que dichos valores.

$$\sigma_r = \sqrt{\frac{1}{N - P} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (4.1)$$

$\sigma_r$  : Error estándar de la regresión

$N$  : Número de datos experimentales

$P$  : Número de parámetros del ajuste

$y$  : Valores experimentales

$\hat{y}$  : Valores estimados

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

### 5.1. Celda de transmisión de alta presión

Se construyeron dos celdas de transmisión de alta presión. En la Figura 5.1 se muestra su diagrama de construcción y en la Figura 5.2 se muestran dos fotografías de una de las celdas. Ambas celdas fueron utilizadas a lo largo del presente proyecto; validando así su uso para llevar a cabo mediciones cinéticas de reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos.

### 5.2. Cinética enzimática

En la Figura 5.3 se muestra el comportamiento típico obtenido a partir de las mediciones cinéticas a lo largo del proyecto, así como su control con enzima inactiva. Se pueden observar tres aspectos importantes:

- Al inicio de las mediciones existe una alta variabilidad de temperatura y presión, además de que se presenta el cambio de fase para el caso del  $s\text{CO}_2$ ; lo cual se refleja en una variabilidad en la absorbancia. Por consiguiente, se descartaron los primeros dos minutos de las mediciones cinéticas en R-134a, y los primeros diez minutos en  $s\text{CO}_2$ .
- Para los experimentos con enzima inactiva, la absorbancia permanece constante a lo largo de las mediciones, lo que asegura que no existe hidrólisis no catalizada.

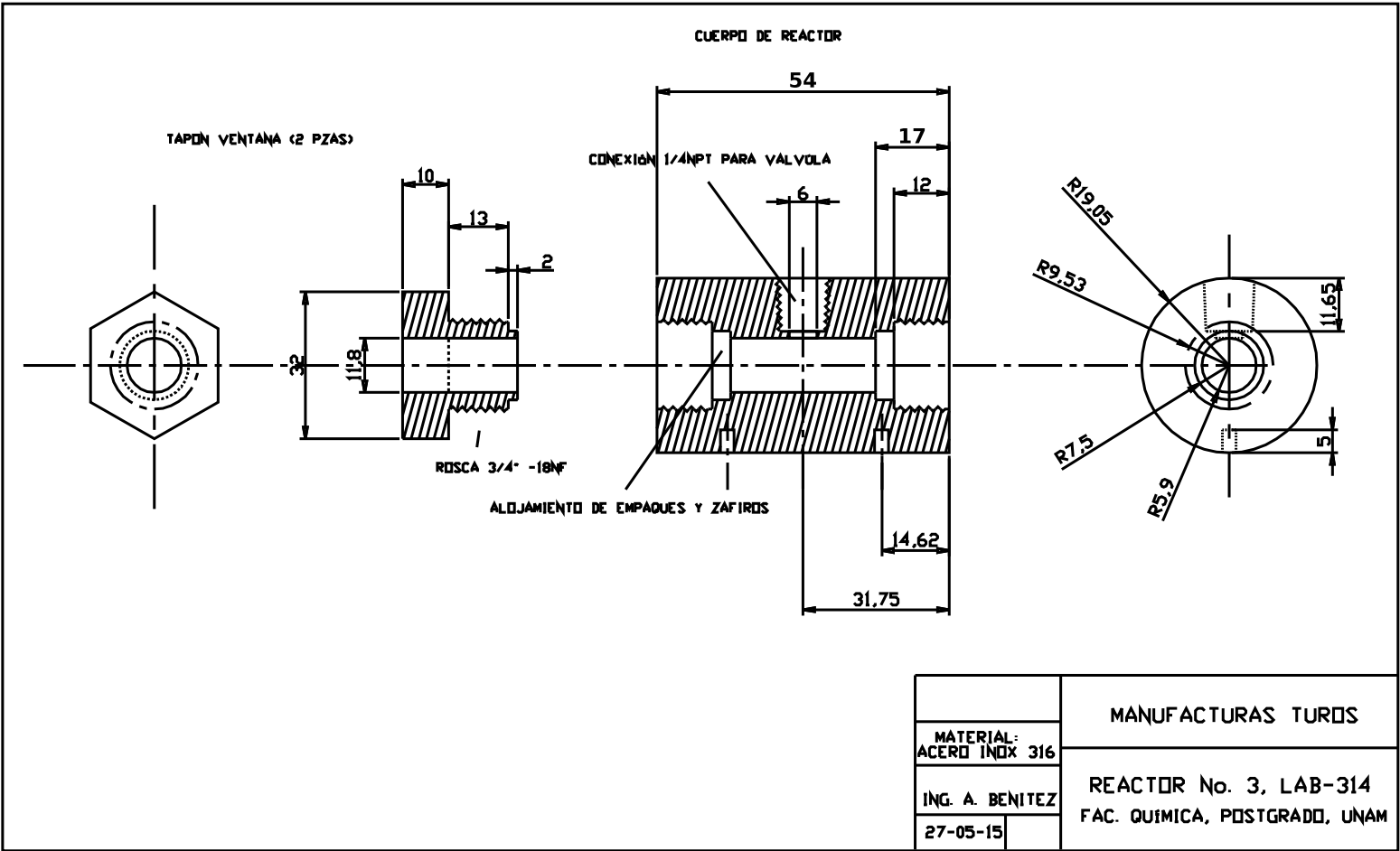


Figura 5.1: Diagrama de construcción de la celda de transmisión



**Figura 5.2:** Fotografías de la celda de transmisión de alta presión

- En las curvas cinéticas se puede observar un comportamiento asintótico hacia un valor distinto de cero, lo cual sugiere que se trata de una reacción reversible, característica importante al elegir un modelo cinético apropiado.

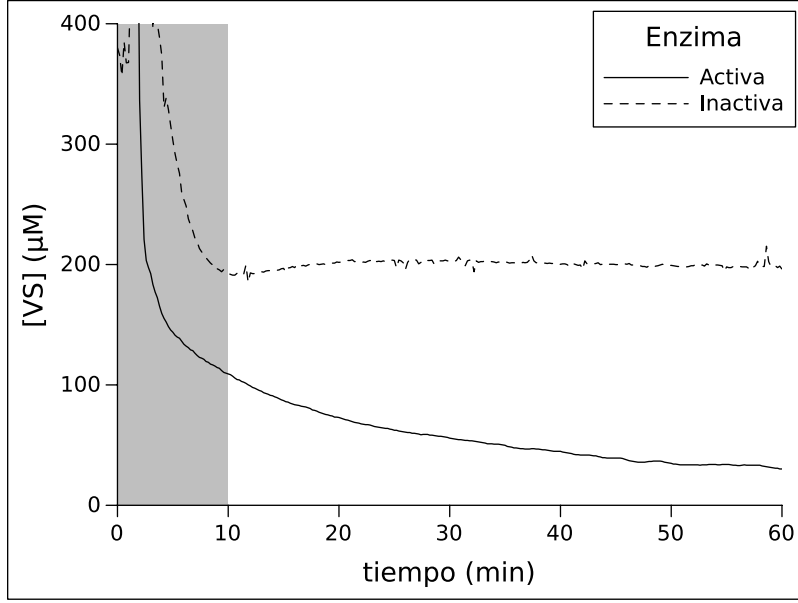
### 5.2.1. Modelo cinético

A pesar de que se trata de una reacción de dos sustratos, se considera que la concentración de uno de ellos, el agua, permanece constante a lo largo de la reacción; ya que su fracción molar es mucho mayor que la del VS, además de que la disolución salina saturada contribuye a mantenerla.

Se propone un modelo enzimático tipo Michaelis-Menten con las dos etapas reversibles: la unión del sustrato (S) con la enzima libre (E) para formar el complejo enzimático (C), y la separación del producto (P) y la enzima. El esquema de reacción se puede representar por la Ecuación 5.1.



Para un reactor intermitente, el modelo presentado en la Ecuación 5.1 resulta en el mecanismo mostrado en las Ecuaciones 5.2. Cabe destacar que se utiliza la aproximación del estado estacionario para el complejo enzimático, que señala que su



**Figura 5.3:** Curva cinética de hidrólisis de VS en  $s\text{CO}_2$  y  $a_w = 0.113$ . Se muestra una etapa de estabilización durante los primeros minutos de las mediciones (color gris).

concentración es pequeña y se mantiene constante a lo largo de la reacción (Ecuación 5.2d).

$$\frac{dS}{dt} = k_2C - k_1ES \quad (5.2a)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_3C - k_4EP \quad (5.2b)$$

$$\frac{dE}{dt} = (k_2 + k_3)C - k_1ES - k_4EP \quad (5.2c)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_1ES + k_4EP - (k_2 + k_3)C \quad (5.2d)$$

El balance de materia (molar) para enzima y sustrato se muestran en las Ecuaciones 5.3; donde  $E_T$  se refiere a la concentración total de enzima;  $S_0$  y  $P_0$  representan las concentraciones iniciales de sustrato y producto, respectivamente. Dado que la concentración de complejo enzimático es pequeña comparada con la de la enzima total, y a su vez la concentración de enzima es muy baja en comparación con la del sustrato o producto, en el balance de sustrato se puede despreciar el término referente al complejo enzimático; por otro lado, los experimentos se realizaron sin producto



inicial, eliminando los términos respectivos de la Ecuación 5.3b.

$$E_T = E + C \quad (5.3a)$$

$$S_0 + P_0 = S + P + C \quad (5.3b)$$

De las ecuaciones 5.2 y 5.3, se puede obtener la rapidez de reacción ( $r$ ) para el sistema, como se muestra en la Ecuación 5.4. Cabe mencionar que la rapidez alcanza un valor nulo cuando la concentración de sustrato llega al valor de equilibrio ( $S_{eq}$ ).

$$r = -\frac{dS}{dt} = \frac{E_T(S - S_{eq})}{Q_1S + Q_2} \quad (5.4)$$

con los parámetros constantes:

$$S_{eq} = \frac{k_2k_4S_0}{k_1k_3 + k_2k_4}$$

$$Q_1 = \frac{k_1 - k_4}{k_1k_3 + k_2k_4}$$

$$Q_2 = \frac{k_2 + k_3 + k_4S_0}{k_1k_3 + k_2k_4}$$

Finalmente, la Ecuación 5.4 se integra para obtener la Ecuación 5.5; donde los parámetros “A” y “B” proporcionan información sobre qué tan lenta es la enzima, y son de gran utilidad para modelar el tiempo de reacción ( $t$ ) necesario para alcanzar una concentración de sustrato dada.

$$t = \alpha + \beta \quad (5.5)$$

$$\alpha = A(S_0 - S) \quad , \quad A = \frac{Q_1}{E_T}$$

$$\beta = B \ln \left( \frac{S_0 - S_{eq}}{S - S_{eq}} \right) \quad , \quad B = \frac{Q_1S_{eq} + Q_2}{E_T}$$

### 5.2.2. Ajuste y simplificación del modelo

Cada serie de datos se ajustó por el método de mínimos cuadrados a la Ecuación 5.5 para obtener los parámetros “A”, “B” y “ $S_{eq}$ ”. Por otro lado, es importante destacar los dos términos presentes en la Ecuación 5.5:

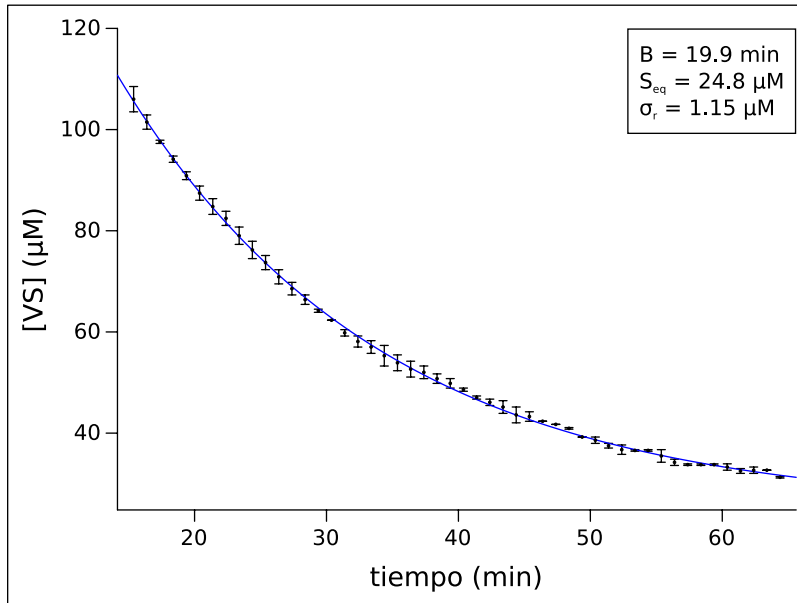
**Término lineal ( $\alpha$ ):** Representa la fracción correspondiente a una reacción de orden cero, en la que el tiempo de reacción es directamente proporcional a la concentración de producto deseado. Este término tiene predominancia cuando la rapidez de reacción es constante; cuando la enzima está mayoritariamente saturada por el sustrato y hay muy poca enzima libre.

**Término logarítmico ( $\beta$ ):** Representa la fracción correspondiente a una reacción de primer orden, en la que el tiempo de reacción tiene una relación logarítmica con la cantidad de sustrato por reaccionar. Este término predomina cuando la rapidez de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato que puede reaccionar, es decir, cuando la enzima está mayoritariamente libre, y hay muy poca enzima ocupada por el sustrato.

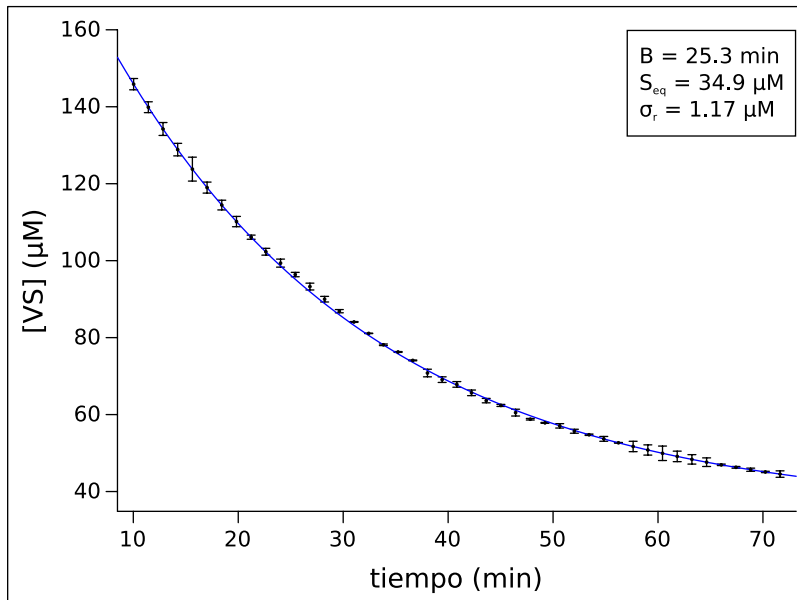
Para todos los experimentos realizados en el presente proyecto, los valores obtenidos del término logarítmico ( $\beta$ ) fueron mayores a los del término lineal ( $\alpha$ ) en por lo menos tres órdenes de magnitud. Esto sugiere que la enzima está principalmente insaturada; y al mismo tiempo, indica que el valor obtenido del parámetro “A” no es confiable. Debido a lo anterior, se determinó “ $\beta$ ” como el término principal y se ajustaron los datos por mínimos cuadrados para obtener únicamente los parámetros “B” y “ $S_{eq}$ ” de la Ecuación 5.6.

$$t \simeq \beta = B \ln \left( \frac{S_0 - S_{eq}}{S - S_{eq}} \right) \quad (5.6)$$

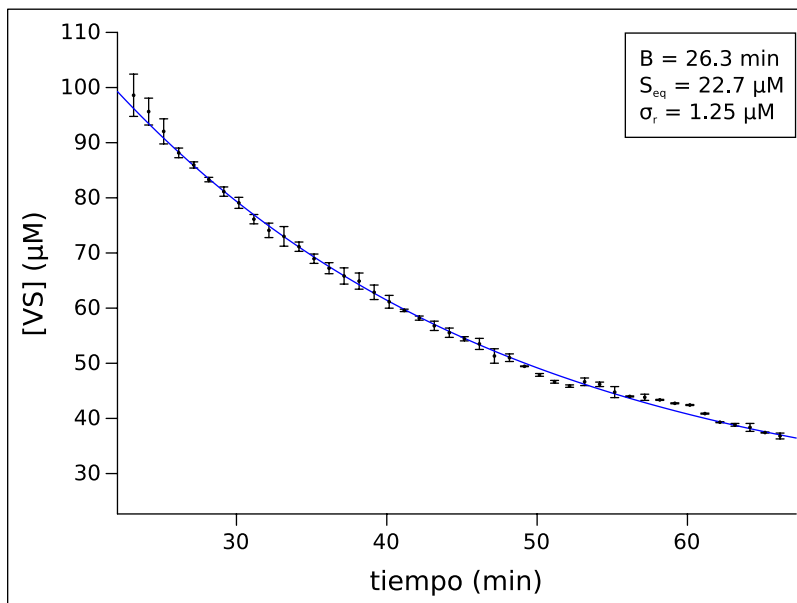
Las Figuras 5.4 a 5.15 muestran que el modelo propuesto (Ecuación 5.5) describe adecuadamente todos los datos experimentales para ambos FCs; asimismo, se puede observar que la simplificación del modelo (Ecuación 5.6) es aceptable bajo las condiciones de reacción utilizadas.



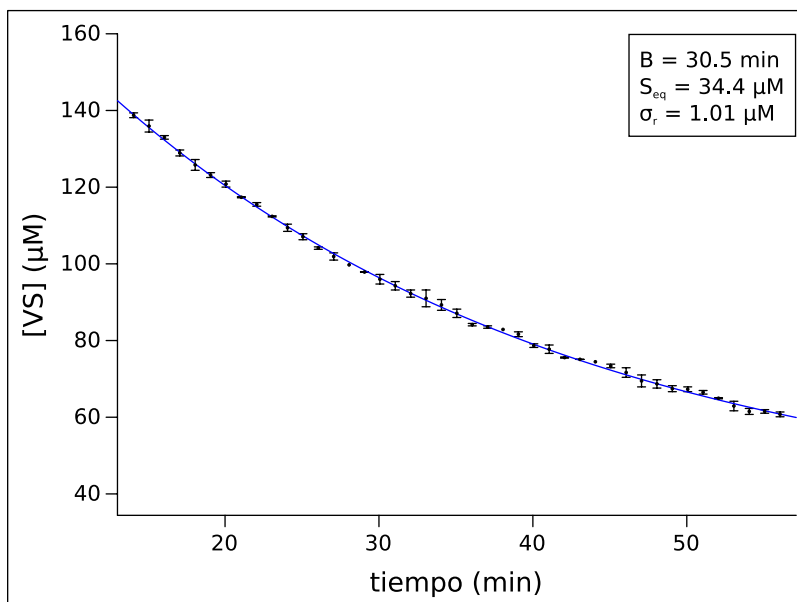
**Figura 5.4:** Curva cinética en sCO<sub>2</sub> con LiCl ( $a_w = 0.113$ )



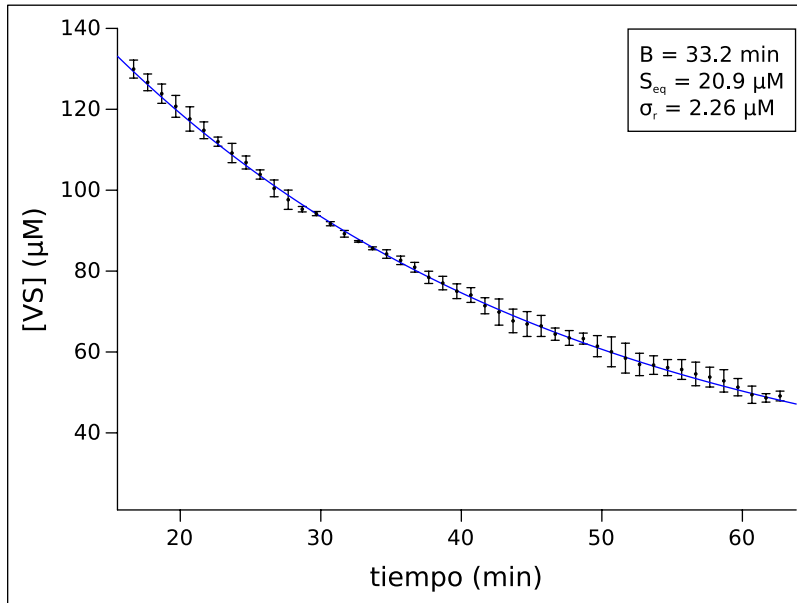
**Figura 5.5:** Curva cinética en sCO<sub>2</sub> con MgCl<sub>2</sub> ( $a_w = 0.321$ )



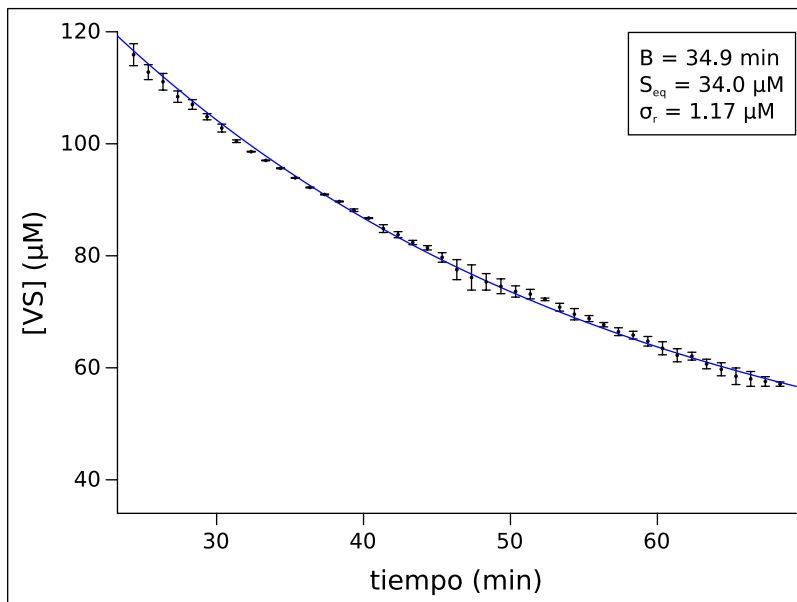
**Figura 5.6:** Curva cinética en  $\text{sCO}_2$  con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ( $a_w = 0.432$ )



**Figura 5.7:** Curva cinética en  $\text{sCO}_2$  con  $\text{NaBr}$  ( $a_w = 0.546$ )



**Figura 5.8:** Curva cinética en  $s\text{CO}_2$  con NaCl ( $a_w = 0.749$ )



**Figura 5.9:** Curva cinética en  $s\text{CO}_2$  con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ( $a_w = 0.967$ )

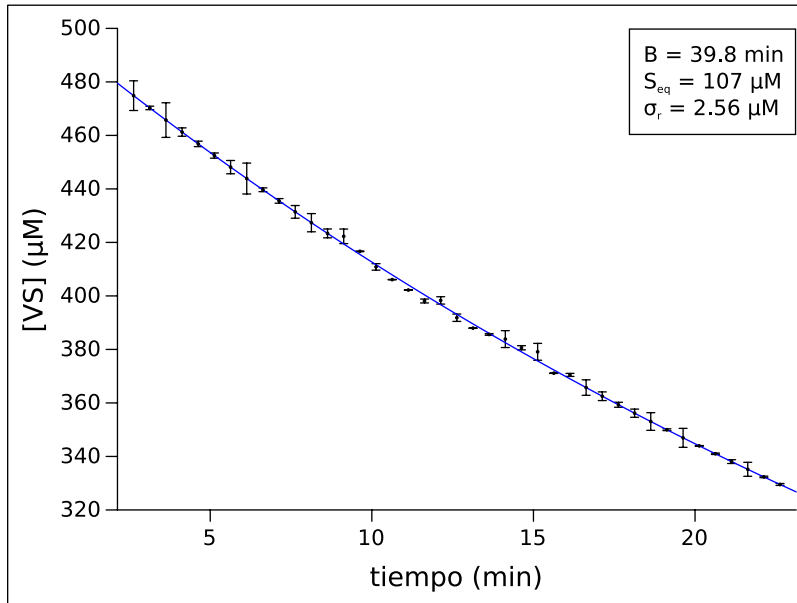


Figura 5.10: Curva cinética en R-134a con LiCl ( $a_w = 0.113$ )

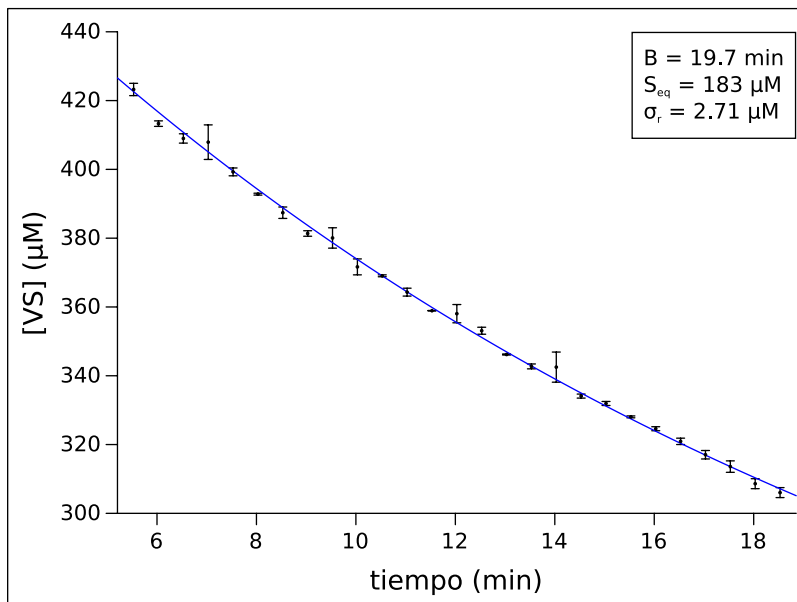


Figura 5.11: Curva cinética en R-134a con  $\text{MgCl}_2$  ( $a_w = 0.321$ )

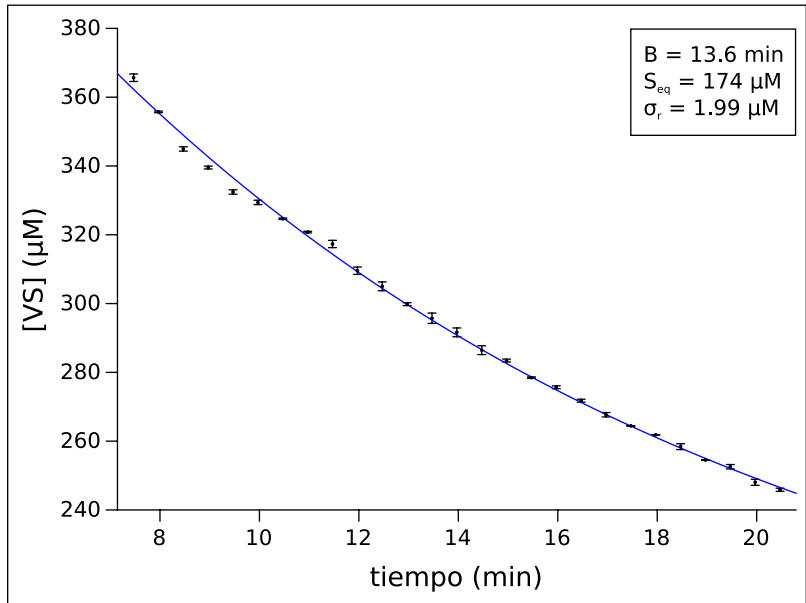


Figura 5.12: Curva cinética en R-134a con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ( $a_w = 0.432$ )

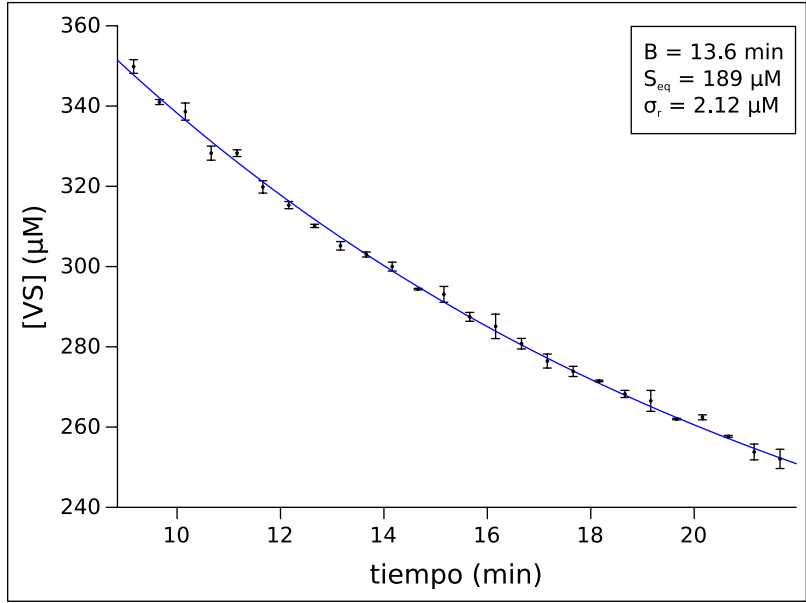
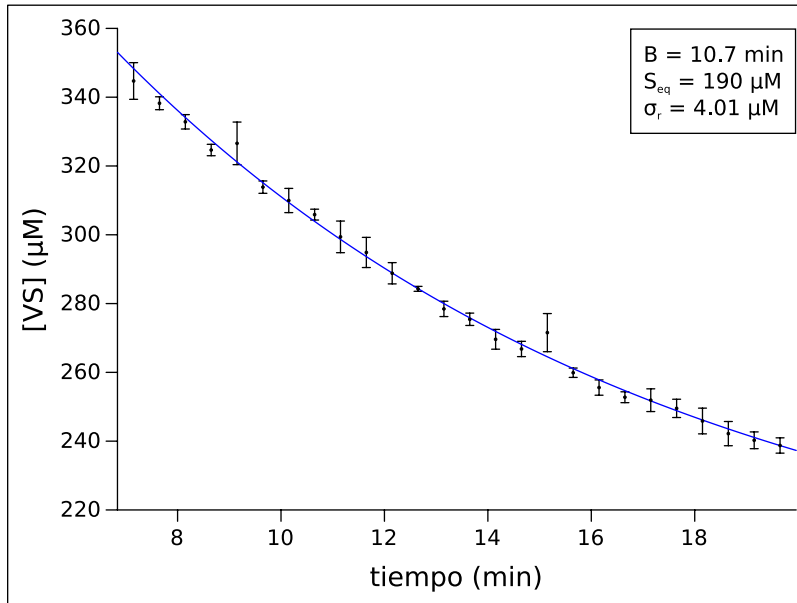
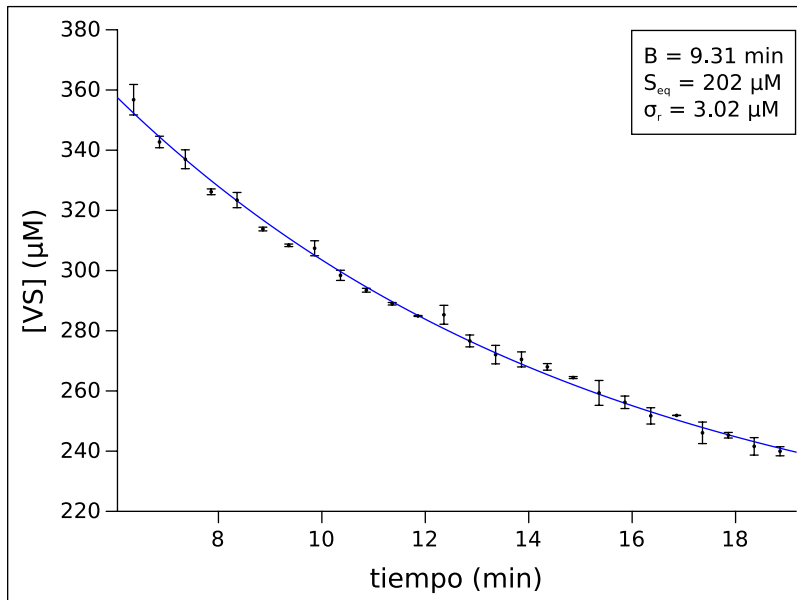


Figura 5.13: Curva cinética en R-134a con  $\text{NaBr}$  ( $a_w = 0.546$ )



**Figura 5.14:** Curva cinética en R-134a con NaCl ( $a_w = 0.749$ )



**Figura 5.15:** Curva cinética en R-134a con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $a_w = 0.967$ )



### 5.2.3. Rapidez de reacción

Considerando el parámetro “B” de la Ecuación 5.5, el modelo simplificado (Ecuación 5.6) se puede derivar para obtener una nueva rapidez de reacción. La Ecuación 5.7 muestra que dicha rapidez es proporcional a la cantidad de enzima y a la concentración de sustrato que puede reaccionar, y la constante de proporcionalidad (k) se obtiene como parámetro cinético del sistema. Cabe destacar que la constante “k” es análoga a la constante de especificidad del modelo de Michaelis-Menten ( $k_{cat}/K_M$ ), considerando una reacción reversible y que la enzima está mayoritariamente libre.

$$r = -\frac{dS}{dt} = kE_T(S - S_{eq}) \quad (5.7)$$
$$k = \frac{1}{BE_T} = \frac{1}{Q_1S_{eq} + Q_2}$$

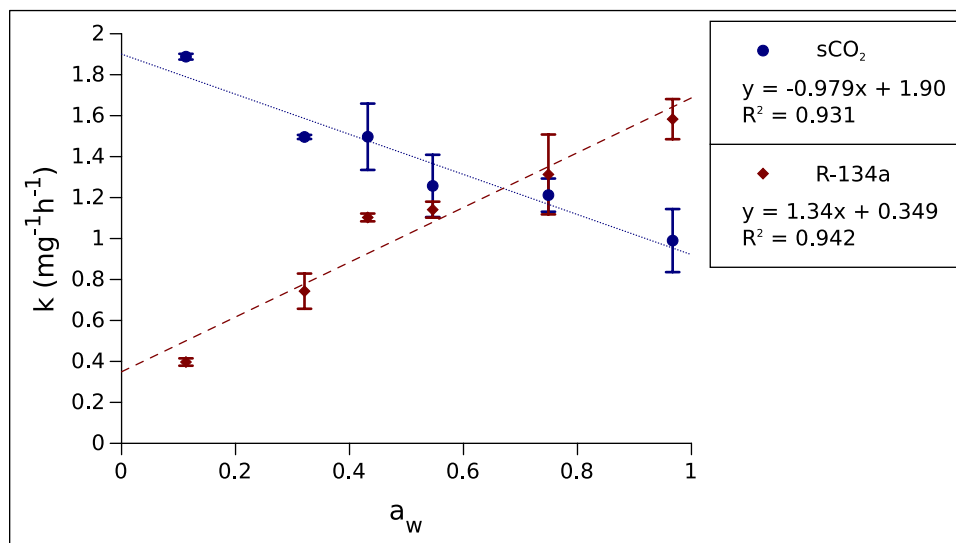
## 5.3. Efecto del agua

### 5.3.1. Rapidez de reacción

La Figura 5.16 muestra las constantes cinéticas obtenidas en función de la actividad de agua para cada fluido comprimido. Se puede observar un comportamiento opuesto en cada caso; mientras que la rapidez aumenta al incrementar el contenido de agua en R-134a, en sCO<sub>2</sub> se presenta una tendencia opuesta.

En el caso del sCO<sub>2</sub>, como se puede observar en la Figura 5.16, a pesar de tratarse de una reacción de hidrólisis, su rapidez disminuye al incrementar la cantidad de agua. Un comportamiento similar ya se había reportado anteriormente<sup>(21)</sup> para sistemas enzimáticos en medios no polares. Para explicar este comportamiento se propuso un modelo en el que tanto el agua como el sustrato compiten por los sitios de adsorción en el catalizador (Figura 5.17A), de manera que al incrementar la cantidad de agua en el medio hidrofóbico, la mayoría migrará a la superficie del catalizador, impidiendo el acceso del sustrato y por consiguiente reduciendo la rapidez de reacción (Figura 5.17B).

Por otro lado, para el caso del R-134a, al ser un medio menos hidrofóbico, tiene mayor capacidad para solvatar al agua e incluso retirarla de las enzimas si la humedad es baja,<sup>(15)</sup> como se representa en la Figura 5.17C; en este caso, al aumentar



**Figura 5.16:** Efecto del agua sobre la constante cinética

la concentración de agua, ésta se particiona hacia la superficie del catalizador, incrementando la movilidad y la actividad de la enzima (Figura 5.17D). Este modelo concuerda con los resultados obtenidos en el presente proyecto, por lo que podría explicar el comportamiento observado en la Figura 5.16.

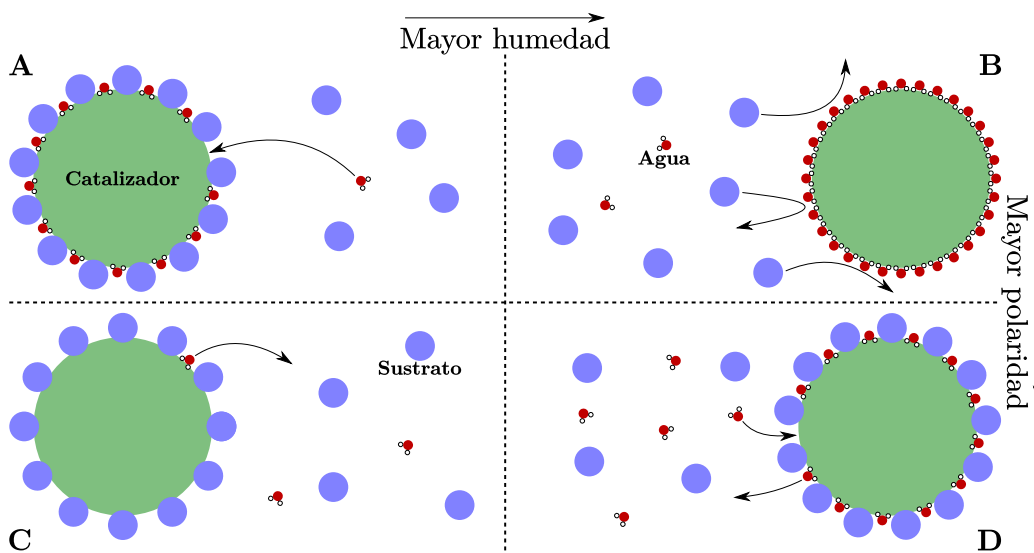
### 5.3.2. Equilibrio termodinámico

Teniendo en cuenta el balance de materia del sustrato (Ecuación 5.3b), se puede definir una constante aparente de equilibrio cinético (Ecuación 5.8), la cual se puede obtener a partir de los datos experimentales para determinar su comportamiento en función de la actividad de agua.

$$K_{ap} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{S_0 - S_{eq}}{S_{eq}} \quad (5.8)$$

No obstante, en las reacciones estudiadas en este proyecto se presentan simultáneamente dos diferentes fenómenos de equilibrio:

**Reacciones:** En la superficie del catalizador, denotado en las ecuaciones con una barra superior, ocurre la hidrólisis de estearato de vinilo para producir ácido esteárico (SA) y alcohol vinílico (VA). Por otro lado, la tautomerización del



**Figura 5.17:** Actividad enzimática en FCs como función de su polaridad y humedad. A) Actividad normal en medio hidrofóbico con humedad baja. B) Inhibición por agua en medio hidrofóbico. C) Baja actividad en medio polar con humedad baja. D) Actividad normal en medio polar con humedad alta.

alcohol en acetaldehído (AA) ocurre sin necesidad de la superficie catalítica (Ecuaciones 5.9).



**Adsorción y desorción:** Todas las especies involucradas tienen la capacidad de adsorberse en la superficie del catalizador, con una constante de equilibrio asociada al proceso (Ecuaciones 5.10).



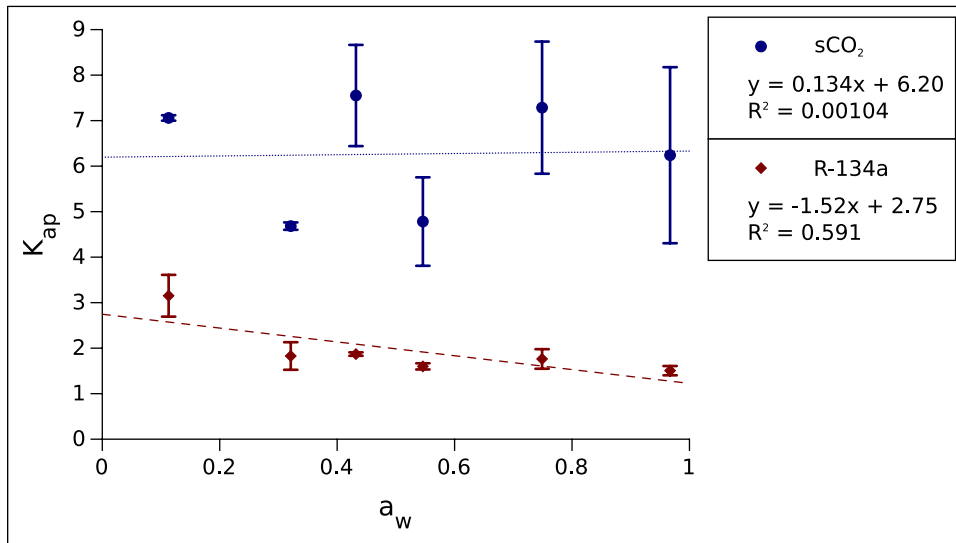
Al llegar al equilibrio termodinámico, todos estos fenómenos alcanzan a su vez el estado de equilibrio, por lo que se puede expresar la constante de equilibrio de reacción en términos de las concentraciones en el medio (Ecuación 5.11).

$$K_{eq} = \frac{K_{SA}K_{VA}}{K_{VS}K_{H_2O}} \cdot \frac{[SA]_{eq}[VA]_{eq}}{[VS]_{eq}[H_2O]_{eq}} = K_{ap} \cdot \frac{K_{SA}K_{VA}}{K_{VS}K_{H_2O}} \cdot \frac{[VA]_{eq}}{[H_2O]_{eq}} \quad (5.11)$$

La Figura 5.18 muestra el efecto del agua y del FC sobre las constantes aparentes de equilibrio obtenidas a partir de los datos experimentales. Con base en los coeficientes de determinación, no se puede observar una tendencia clara en función de la actividad de agua, lo cual es consistente con la suposición de que a pesar de añadir agua al sistema, ésta se encuentra en exceso y permanece casi constante, manteniendo también el parámetro “ $K_{ap}$ ”.

Por otro lado, se observa que en todos los casos la constante aparente es mayor para el sCO<sub>2</sub>, lo cual se puede explicar por la polaridad del FC, que afecta principalmente la constante de adsorción del agua en la superficie del catalizador ( $K_{H_2O}$ ).

Dada su hidrofobicidad, en el sCO<sub>2</sub> la mayor parte de las moléculas de agua migrará hacia la superficie del catalizador; dicho de otro modo, la “ $K_{H_2O}$ ” en el sCO<sub>2</sub> es mayor que en R-134a. Como se observa en la Ecuación 5.11, para mantener la constante de reacción ( $K_{eq}$ ) es necesario un incremento en “ $K_{ap}$ ”. Esto refuerza la propuesta de inhibición por agua en medios hidrofóbicos (Figura 5.17), además de ofrecer un estimado de la diferencia del contenido de agua entre los dos medios. No obstante, se requieren experimentos con mayor tiempo de reacción para determinar con precisión los parámetros de equilibrio.



**Figura 5.18:** Efecto del FC sobre la constante aparente de equilibrio. Los resultados obtenidos no son concluyentes respecto al efecto del agua sobre este parámetro.

# Conclusiones

- Se diseñó y construyó una celda de transmisión capaz de soportar presiones de hasta 30 MPa; asimismo, se probó su efectividad dentro de un espectrofotómetro convencional para realizar *in situ* mediciones cinéticas de reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos.
- Se determinó, de manera similar a lo observado para medios orgánicos, que el contenido de agua ejerce un efecto importante sobre la cinética de una reacción enzimática en fluidos comprimidos, como en este caso para la hidrólisis del estearato de vinilo
- El efecto de agua mencionado depende de la naturaleza del fluido comprimido; siendo así que en R-134a la actividad de hidrólisis de la lipasa B de *Candida antarctica* aumenta a medida que se incrementa el  $a_w$ , mientras en sCO<sub>2</sub> el efecto es opuesto. Esto podría deberse a que, al ser un fluido más hidrofóbico, se presenta un fenómeno de inhibición por moléculas de agua acumuladas sobre la superficie catalítica.
- Los modelos cinéticos planteados son adecuados para describir los datos experimentales obtenidos en línea para las diferentes humedades relativas.
- Para la reacción modelo, los datos experimentales validaron la expectativa de distinguir en línea los efectos de la humedad y su relación con el fluido comprimido.
- Los resultados validan el empleo de la celda diseñada y construida para el estudio de reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos.

- La celda diseñada, construida y utilizada en este proyecto presenta tres principales ventajas sobre otras técnicas de medición para sistemas enzimáticos en fluidos comprimidos:
  - Al no requerir muestras materiales, se pueden realizar mediciones *in situ* y sin pérdidas de presión
  - Debido a sus dimensiones, el consumo de reactivos, la generación de residuos y el gasto energético son reducidos
  - Puesto que no se requieren equipos altamente especializados, p. ej. espectrofotómetro de flujo, el costo de esta técnica también es reducido (Aproximadamente 10 000 MXN por celda en 2016).

# Bibliografía

- [1] Roger A. Sheldon. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chemistry*, 16(3):950–963, 2014.
- [2] M. Ikeda. Public health problems of organic solvents. *Toxicology letters*, 64: 191–201, 1992.
- [3] Martyn Poliakoff, J. Michael Fitzpatrick, Trevor R. Farren, y Paul T. Anastas. Green chemistry: science and politics of change. *Science*, 297(5582):807–810, 2002.
- [4] Michel Perrut. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues. *Industrial & engineering chemistry research*, 39(12):4531–4535, 2000.
- [5] Zeljko Knez y Maja Habulin. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. *The Journal of supercritical fluids*, 23(1):29–42, 2002.
- [6] Zdenuek Wimmer y Marie Zarevúcka. A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *International journal of molecular sciences*, 11(1):233–253, 2010. doi: 10.3390/ijms11010233.
- [7] Nediljko Budisa y Dirk Schulze-Makuch. Supercritical carbon dioxide and its potential as a life-sustaining solvent in a planetary environment. *Life*, 4(3): 331–340, 2014. doi: 10.3390/life4030331.
- [8] Pawel L. Urban, David M. Goodall, Edmund T. Bergström, y Neil C. Bruce. On-line low-volume transesterification-based assay for immobilized lipases. *Journal of biotechnology*, 126(4):508–518, 2006.



- [9] Aravamudan S. Gopalan, Chien M. Wai, y Hollie K. Jacobs. *Supercritical Carbon Dioxide: Separations and Processes*. ACS Publications, 2003.
- [10] Kevin Jackson, Lawrence E. Bowman, y John L. Fulton. Water solubility measurements in supercritical fluids and high-pressure liquids using near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 67(14):2368–2372, 1995.
- [11] Da-Qing Zheng, Tian-Min Guo, y Helmut Knapp. Experimental and modeling studies on the solubility of  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{F}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{F}_4$  and  $\text{C}_2\text{H}_4\text{F}_2$  in water and aqueous NaCl solutions under low pressures. *Fluid phase equilibria*, 129(1):197–209, 1997.
- [12] Stuart Corr. 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent. *Journal of Fluorine Chemistry*, 118(1):55–67, 2002.
- [13] Yizhak Marcus. Solvatochromic probes in supercritical fluids. *Journal of physical organic chemistry*, 18(5):373–384, 2005.
- [14] U. Bornscheuer, A. Capewell, V. Wendel, y T. Scheper. On-line determination of the conversion in a lipase-catalyzed kinetic resolution in supercritical carbon dioxide. *Journal of biotechnology*, 46(2):139–143, 1996.
- [15] Noriyuki Doukyu y Hiroyasu Ogino. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3):270–282, 2010. doi: 10.1016/j.bej.2009.09.009.
- [16] Alexander M. Klibanov. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in biotechnology*, 15(3):97–101, 1997.
- [17] Aleksey Zaks y Alexander M. Klibanov. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17):8017–8021, 1988.
- [18] Alexander M. Klibanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(6817):241–246, 2001.
- [19] Juan Mauricio Mora Pale. *Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua*. PhD thesis, Facultad de Química, UNAM, 2007.

- [20] Nuno M. Micaêlo y Claudio M. Soares. Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. *Febs Journal*, 274(9):2424–2436, 2007. doi: 111/j.1742-4658.2007.05781.x.
- [21] J. Mauricio Mora-Pale, Sandra Pérez-Munguía, Jessica C. González-Mejía, Jonathan S. Dordick, y Eduardo Bárzana. The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non-aqueous media is favored at extremely low water activities. *Biotechnology and bioengineering*, 98(3):535–542, 2007. doi: 10.1002/bit.21417.
- [22] Roeb García-Arrazola, Miquel Gimeno, y Eduardo Bárzana. Effect of the initial water activity on the yields and molecular wweights of the lipase-catalysed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid r-134a. *e-Polymers*, 8(1): 203–208, 2008.
- [23] Shiro Kobayashi. Lipase-catalyzed polyester synthesis—a green polymer chemistry. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 86(4):338, n/a 2010. doi: 10.2183/pjab.86.338.
- [24] Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Lee Poh Geok, Mahiran Basri, y Abu Bakar Salleh. An organic solvent-tolerant protease from pseudomonas aeruginosa strain k: Nutritional factors affecting protease production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5):749–757, 2005.
- [25] Diya Alsafadi y Francesca Paradisi. Effect of organic solvents on the activity and stability of halophilic alcohol dehydrogenase (adh2) from haloferax volcanii. *Extremophiles*, 17(1):115–122, 2013. doi: 10.1007/s00792-012-0498-0.
- [26] Mohammad Shafiei, Abed-Ali Ziaee, y Mohammad Ali Amoozegar. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic  $\alpha$ -amylase from the moderately halophilic nesterenkonia sp. strain f. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(2):275–281, 2011.
- [27] Noriyuki Doukyu, Kanpei Shibata, Hiroyasu Ogino, y Martin Sagermann. Purification and characterization of chromobacterium sp. ds-1 cholesterol oxidase with thermal, organic solvent, and detergent tolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1):59, 2008.

- [28] Masaaki Ito y Kohei Oda. An organic solvent resistant tyrosinase from streptomyces sp. ren-21: purification and characterization. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(2):261–267, 2000.
- [29] Giovanna Cacciapuoti, Costanzo Bertoldo, Assunta Brio, Vincenzo Zappia, y Marina Porcelli. Purification and characterization of 5\*-methylthioadenosine phosphorylase from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus furiosus. *Extremophiles*, 7(2):159–168, 2003.
- [30] A. Marty, W. Chulalaksananukul, R. M. Willemot, y J. S. Condoret. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical co<sub>2</sub>. *Biotechnology and bioengineering*, 39(3):273–280, 1992.
- [31] J. W. Hampson y T. A. Foglia. Effect of moisture content on immobilized lipase-catalyzed triacylglycerol hydrolysis under supercritical carbon dioxide flow in a tubular fixed-bed reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7):777–781, 1999.
- [32] Philippe dos Santos, Camila A. Rezende, y Julian Martínez. Activity of immobilized lipase from candida antarctica (lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107:170–178, 2016.
- [33] J. P. Blitz, J. L. Fulton, y R. D. Smith. Near-and mid-infrared transmission cells for the study of reverse micelle phases in supercritical fluids. *Applied Spectroscopy*, 43(5):812–816, 1989.
- [34] L Goujard, P Villeneuve, B Barea, J Lecomte, M Pina, S Claude, J Le Petit, y E Ferré. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Anal. Biochem.*, 385(1):161–7, 2009. doi: 10.1016/j.ab.2008.10.025.
- [35] Lewis Greenspan et al. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of research of the national bureau of standards*, 81(1):89–96, 1977.