



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

Cinética de la Interesterificación Enzimática  
de Aceites Vegetales

**Consuelo Pacheco**

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2012





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

Cinética de la Interesterificación Enzimática  
de Aceites Vegetales

**Consuelo Pacheco**

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2012

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2006 y el 1 de marzo de 2012, bajo la dirección de los Dres. Guillermo H. Crapiste y María Elena Carrín.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el     /     /     , mereciendo la  
calificación de     (     ).

# AGRADECIMIENTOS

Quien no sepa lo que significa para mí estar hoy escribiendo estos agradecimientos no puede imaginarse lo importantes que son.

Quisiera comenzar agradeciendo a mis directores. A Guillermo por su confianza desde el primer día y por haber respondido cada vez que lo necesité. A María Elena el más grande de los agradecimientos; por tantos motivos que seguramente me olvidaré de alguno. Por apoyarme y acompañarme siempre, por su inmensa capacidad de comprensión, por su calidez humana, por levantarme tantísimas veces y ayudarme a seguir, porque si no hubiera sido por sus palabras de aliento y esos mails tan cariñosos estos agradecimientos se hubieran, al menos, retrasado. Por su enorme generosidad, por su permanente buen humor y carácter, por haber sido una madre en tantos momentos y, sobre todo, por haberme demostrado ser tan excelente persona.

Un especial agradecimiento a Forbi, principalmente por esos meses en que la lógica no funcionaba y mis ganas se apagaban. Por cargar con el problema como propio y hacer lo imposible para resolverlo. Porque, incluso habiendo llegado a límites en que la paciencia se agotaba, su eterno buen humor y disposición hicieron que no se notara.

A tanta gente que con sus actitudes me convenció de que este lugar está lleno de buenas personas. Al Grupo de Reactores en general por haberme hecho sentir en muchos momentos parte de él. Por permitirme usar su cromatógrafo, que tan necesario me resultaba en ese momento. Agradezco especialmente a Verónica (Bucalá), quien fue siguiendo mis pasos a lo largo de estos años animándome a seguir y aconsejándome. Gracias en particular por la preocupación del último año, no sólo a nivel tesis; sino, y especialmente, a nivel personal. Gracias a Susy (Schbib) por la ayuda totalmente desinteresada que me brindó con las rutinas de Fortran. A Juliana (Piña) por su interés y preocupación y por esos consejos que tanto me llegaron.

Agradezco a mis amigos del alma que supieron escucharme y acompañarme tanto durante estos años, preocupándose en los momentos de angustia y alegrándose

conmigo en los de felicidad. A Fer, Gi, Bere, Vir y Meli un agradecimiento más que especial por acompañarme y animarme como sólo los buenos amigos pueden hacerlo. Gracias por estar siempre. Gracias a Mer y Guada que, a pesar de la distancia física, sigo contando con ellas desde hace ya 27 años. A Rodrigo, que me hizo tan buena compañía ese primer año de cursos y ahora a la distancia me la sigue brindando. A Diego (Bertín) mil gracias por la preocupación de siempre, por tantos momentos compartidos y por ofrecerse siempre a ayudarme. Gracias a Ana Julia, con quien hace 12 años no sólo compartimos el mismo camino académico sino también una linda amistad. Quiero agradecer de manera especial a una persona que me sostuvo muchísimo en el día a día. Gracias Cami por acompañarme y escucharme tanto, y especialmente por todos los momentos que compartimos juntas, de risas y de llantos; gracias por tan linda amistad. Gracias a Santi que me acompañó durante gran parte del desarrollo de esta tesis, por tanto amor.

Agradezco a mis compañeros del Grupo de Alimentos. A Clarisa por la ayuda que me brindó con algunas técnicas analíticas. Gracias a Lau (Goñi) por esas charlas eternas en las que compartíamos penurias y nos dábamos ánimo mutuamente, pero que siempre terminaban en un “todo se acomoda”, como está pasando ahora. Gracias a mis compañeras de oficina Mariela (Acosta), Irene (Rubel) y Ticiania (Soria) por los momentos compartidos. Gracias Ire por las charlas y consejos, y Tici por estos meses de tan linda compañía, por ofrecerte siempre a ayudarme de corazón y por alimentarme (jaja). Gracias a Pipi por los años de amistad, por haber estado durante tanto tiempo.

Gracias a todos con los que compartí lindos momentos: Ivi, Lore, Agus, Jhon, Luz, Jime; a Vani, que además estuvo en otros no tan lindos; gracias a Espi por esas horas de pura solidaridad. Gracias a Juan por acompañarme tanto y por hacerme ver las cosas tanto más simples.

Quiero agradecer a las secretarias, especialmente a Elsa por todas esas mañanas en que me pasaba a buscar por mi casa y a Nora, por sentir propias mis penas y alegrías.

Agradezco también al Grupo de Polímeros por permitirme usar sus equipos; especialmente a Cristina (Frova), Gustavo (Massimiliani) y Daniel (Ércoli) por su tiempo y buena predisposición para enseñarme a usarlos.

Quisiera agradecer a la Planta Piloto de Ingeniería Química, a la Universidad Nacional del Sur y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la posibilidad de llevar a cabo el doctorado en mi país.

Y por último y principal, GRACIAS a mi familia, a mis papás Julio y Pilar y a mis hermanos Sebastián, Agustín y Martín. Gracias por apoyarme siempre y hacer lo imposible para que sea feliz. Gracias básicamente por hacer que hoy haya llegado hasta acá.

“Ad astra per aspera”

Séneca



# RESUMEN

---

La creciente demanda por parte de la industria alimentaria de grasas sólidas y semisólidas con distintas propiedades reológicas y organolépticas ha impulsado el desarrollo de diversas tecnologías y procesos industriales, minimizando la producción de compuestos perjudiciales para la salud del consumidor. Un proceso relativamente nuevo, principalmente a escala industrial, es el de interesterificación enzimática, el cual consiste en utilizar lipasas como biocatalizadores para intercambiar los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos de al menos dos sustratos de naturaleza oleosa, generalmente diferenciados por sus relaciones de ácidos grasos saturados e insaturados.

En esta tesis se analiza el comportamiento cinético de la reacción de interesterificación enzimática desde distintos puntos de vista, utilizando mezclas de aceite de soja y aceite de soja hidrogenado como sustratos y dos lipasas inmovilizadas comerciales, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM, como biocatalizadores.

En el Capítulo 1 se hace una introducción general al tema de estudio junto con la revisión bibliográfica. Los materiales utilizados y los métodos empleados, algunos de ellos implementados durante el desarrollo de la presente tesis, se describen en el Capítulo 2.

En el Capítulo 3 se analiza, a través de un diseño experimental incompleto, el efecto que tienen las variables operativas y del sistema más relevantes sobre la composición de triglicéridos (agrupados según su grado de insaturación) y de subproductos (diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres), y sobre el punto de fusión de los productos de reacción.

En el Capítulo 4 se realiza el análisis de la evolución en el tiempo de las concentraciones de las diferentes especies involucradas en la reacción en estudio, para los factores definidos anteriormente como más significativos. También se presentan experiencias en sistemas en presencia de hexano y se discute el efecto del solvente sobre la cinética de la reacción.

En vista de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, en el Capítulo 5 se analiza en más detalle la distribución de ácidos grasos saturados e insaturados en los glicéridos, principalmente en la posición *sn*-2. En virtud de los resultados obtenidos con este estudio, se realiza un análisis detallado de la distribución de los diglicéridos entre los isómeros 1(3),2-DAG y 1,3-DAG, que permite discutir el efecto de la acil migración

En el Capítulo 6 se desarrollan diferentes modelos teóricos que podrían representar la variación de las concentraciones de reactivos y productos, teniendo en cuenta las reacciones de hidrólisis y de reesterificación. El desarrollo de los mismos se realizó planteando dos hipótesis: rápido equilibrio y estado estacionario, y diferentes formas de complejación de la enzima, así como también distintos pasos en los cuales la molécula de agua ingresa al esquema de reacción. Estos modelos involucran el conocimiento de diversos parámetros cinéticos y de equilibrio, que deben obtenerse mediante la resolución de los mismos y su correlación con los datos experimentales. Además, se desarrolla un modelo considerando la distribución de los ácidos grasos saturados e insaturados en los distintos glicéridos.

Por último, en el Capítulo 7 se presentan las conclusiones generales derivadas del estudio experimental y teórico desarrollado en la presente tesis y las propuestas futuras de trabajo.

# ABSTRACT

---

The food industry demands more oil and fat products with different rheological and organoleptic properties. Therefore, several new technologies and industrial processes have been developed lately to satisfy these needs, minimizing the production of compounds that harms the consumer health. Enzymatic interesterification is a relatively novel industrial process consisting in lipase-catalyzed reactions that interchange the fatty acids of the structure of the triacylglycerols from two oil products, with different composition in the concentration of saturated and unsaturated fatty acids.

The main objective of this thesis was to study the kinetic behavior of the enzymatic interesterification reaction, using blends of refined soybean oil and hydrogenated soybean oil as substrates, and two commercial immobilized lipases, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM, as biocatalysts.

A general introduction to the subject and the bibliographic revision is presented in Chapter 1. The materials and methods used in the experimental studies carried out in the thesis are described in Chapter 2.

Chapter 3 presents the analysis of the effect of different reaction parameters and operating variables on the composition of triacylglycerols groups (defined in terms

of its unsaturation degree) and byproducts (diacylglycerols, monoacylglycerols and free fatty acids), and on the melting point of the reaction products.

The effect of the most significant parameters on the reaction kinetics, measured as the evolution of the concentration of the different species during the reaction time, is presented in Chapter 4. Experiences in presence of hexane were carried out in order to study the effect of the solvent on the reaction kinetics; they are also presented and discussed in these chapter.

Taking into account the results obtained in the previous study, the distribution of saturated and unsaturated fatty acids in the position *sn*-2 of the triacylglycerols is analyzed in Chapter 5. In addition, a detailed study of the diacylglycerols distribution between the 1(3),2-DAG y 1,3-DAG isomers is presented, which allows to discuss the effect of the acyl migration.

Several theoretical models to represent the variation in the concentration of the species during reaction are developed in Chapter 6, taking into account the hydrolysis and esterification reactions. The derivation of the models was performed using two different approaches: rapid equilibrium and steady state, considering different manners in which the enzyme can undergo complexation and steps in which water molecule enters the reaction scheme. These models require knowledge of the value of different kinetic and equilibrium parameters, which have to be determined through the model solution and its correlation with experimental data. A more complete model that considers the distribution of saturated and unsaturated fatty acids in the acylglycerol species is also presented.

Finally, Chapter 7 summarizes the overall conclusions derived of the experimental and theoretical studies presented in the thesis, and suggests future work on the research topic.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Los Aceites y Grasas y su Funcionalidad .....	2
1.2. Modificación de Lípidos .....	5
1.2.1. Reseña Histórica sobre la Elaboración de Productos Grasos .....	6
1.2.2. Interesterificación .....	8
1.2.2.1. Interesterificación Enzimática .....	11
1.3. Antecedentes y Objetivos .....	14
1.4. Nomenclatura .....	17
1.5. Referencias Bibliográficas .....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Materiales .....	21
2.1.1. Sustratos .....	21
2.1.2. Enzimas .....	21
2.1.3. Reactivos y Solventes.....	22
2.1.4. Otros.....	22
2.2. Métodos .....	22
2.2.1. Purificación del Aceite Hidrogenado .....	22
2.2.2. Índice de Peróxidos (PV) .....	23
2.2.3. Valor de p-Anisidina (p-AV).....	24
2.2.4. Índice de Iodo (IV) .....	24
2.2.5. Contenido de Agua.....	24
2.2.6. Densidad .....	25
2.2.7. Punto de Fusión (mp).....	26
2.2.8. Análisis del Perfil Acídico en Posición <i>sn-2</i> .....	28
2.2.9. Análisis Cromatográficos.....	29
2.2.9.1. Determinación de Ácidos Grasos <i>cis/trans</i> .....	29
2.2.9.1.1. Derivatización de la Muestra .....	29
2.2.9.1.2. Condiciones Cromatográficas.....	30
2.2.9.2. Determinación Conjunta de FFA, MAG, DAG y TAG por CGL.....	34
2.2.9.2.1. Derivatización de la Muestra .....	34
2.2.9.2.2. Condiciones Cromatográficas.....	35

2.2.9.2.3. Método de Cuantificación .....	36
2.2.10. Protocolo de Reacción .....	49
2.2.11. Análisis Estadístico .....	50
2.3. Caracterización de los Sustratos .....	51
2.3.1. Aceites Refinados.....	51
2.3.2. Aceites Hidrogenados .....	55
2.4. Nomenclatura .....	61
2.5. Referencias Bibliográficas .....	62
3. ESTUDIO DE LA REACCIÓN MEDIANTE DISEÑO DE EXPERIMENTOS .....	65
3.1. Introducción .....	66
3.2. Planteo del Diseño .....	68
3.3. Análisis Estadístico .....	73
3.4. Resultados.....	75
3.4.1. Análisis General de la Composición de los Productos .....	75
3.4.2. Estudio de los Parámetros de Reacción.....	79
3.4.2.1. Efectos Principales e Interacciones sobre mp y Generación de Subproductos .....	79
3.4.3. Modelado.....	86
3.4.4. Optimización de las Condiciones de Reacción.....	91
3.4.5. Modelado del mp con la Composición Química .....	93
3.5. Conclusiones .....	96
3.6. Nomenclatura .....	97
3.7. Referencias Bibliográficas .....	98
4. CINÉTICA DE LA REACCIÓN.....	101
4.1. Introducción .....	102
4.2. Condiciones de Reacción .....	104
4.3. Resultados.....	106
4.3.1. Análisis General de los Productos.....	106
4.3.1.1. Composición en TAG de los Productos en el Equilibrio .....	106
4.3.2. Estudio de la Cinética de la Reacción.....	113
4.3.2.1. Lipozyme RM IM.....	113
4.3.2.1.1. Reacciones en Ausencia de Hexano .....	113
4.3.2.1.2. Reacciones en Presencia de Hexano .....	127

4.3.2.2. Lipozyme TL IM.....	137
4.3.2.3. Comparación entre Lipasas .....	150
4.4. Conclusiones .....	155
4.5. Nomenclatura .....	157
4.6. Referencias Bibliográficas .....	157
<b>5. DISTRIBUCIÓN POSICIONAL DE LOS RESIDUOS ACILO EN LOS GLICÉRIDOS.....</b>	<b>160</b>
5.1. Introducción .....	161
5.2. Estudio del Perfil de TAG y Residuos Acilo en la Posición <i>sn</i> -2.....	164
5.2.1. Sustratos .....	164
5.2.2. Predicción de Perfiles de TAG y Relación (%U <sub>2</sub> /%S <sub>2</sub> ) en Productos Interesterificados .....	165
5.2.3. Perfiles Experimentales de TAG y Relación (%U <sub>2</sub> /%S <sub>2</sub> ) en Productos Interesterificados .....	168
5.3. Estudio de Acil Migración.....	173
5.3.1. Sustratos .....	173
5.3.2. Productos de Interesterificación.....	174
5.3.2.1. Efecto del Tipo y Concentración de Enzima .....	175
5.3.2.2. Efecto de la Relación de Sustratos .....	181
5.3.2.3. Efecto del Agregado de Solvente y de la Temperatura.....	183
5.4. Conclusiones .....	185
5.5. Nomenclatura .....	186
5.4. Referencias Bibliográficas .....	186
<b>6. MODELADO CINÉTICO .....</b>	<b>189</b>
6.1. Introducción .....	190
6.2. Fundamento Teórico.....	191
6.2.1. Mecanismos de Reacción.....	191
6.2.2. Derivación de Expresiones de Velocidad de Reacción.....	193
6.3. Modelos Cinéticos.....	194
6.3.1. Mecanismo 1.....	195
6.3.1.1. Compuestos Agrupados .....	196
6.3.1.2. Compuestos Discriminados por Grado de Insaturación .....	197
6.3.2. Mecanismo 2.....	203
6.3.2.1. Ingreso del Agua en la Etapa Posterior a la Liberación del DAG.....	204
6.3.2.1.1. Hipótesis de Rápido Equilibrio.....	204

6.3.2.1.1.1. Paso Limitante 1.....	206
6.3.2.1.1.2. Paso Limitante 2.....	206
6.3.2.1.1.3. Paso Limitante 3.....	207
6.3.2.1.1.4. Paso Limitante 4.....	207
6.3.2.1.1.5. Paso Limitante 5.....	208
6.3.2.1.1.6. Paso Limitante 6.....	209
6.3.2.1.1.7. Paso Limitante A .....	209
6.3.2.1.1.8. Paso Limitante B .....	210
6.3.2.1.1.9. Paso Limitante C .....	211
6.3.2.1.2. Hipótesis de Estado Estacionario .....	211
6.3.2.2. Ingreso del Agua en la Etapa Posterior a la Acilación de la Enzima.	213
6.3.2.2.1. Hipótesis de Rápido Equilibrio.....	213
6.3.2.2.2. Hipótesis de Estado Estacionario .....	214
6.4. Método de Resolución .....	217
6.5. Resultados.....	217
6.5.1. Mecanismo 1.....	218
6.5.2. Mecanismo 2.....	222
6.6. Conclusiones .....	229
6.7. Nomenclatura .....	230
6.8. Referencias Bibliográficas .....	231
7. CONCLUSIONES Y TRABAJOS A FUTURO .....	232
ANEXO.....	238

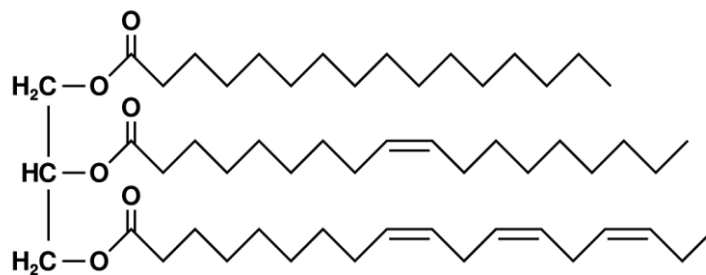


# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. LOS ACEITES Y GRASAS Y SU FUNCIONALIDAD

Los aceites y grasas están constituidos mayoritariamente por triacilgliceroles, comúnmente llamados triglicéridos. Estas moléculas resultan de la esterificación de una unidad del alcohol glicerol con tres unidades de ácidos carboxílicos lineales, denominados comúnmente ácidos grasos (Figura 1.1.).



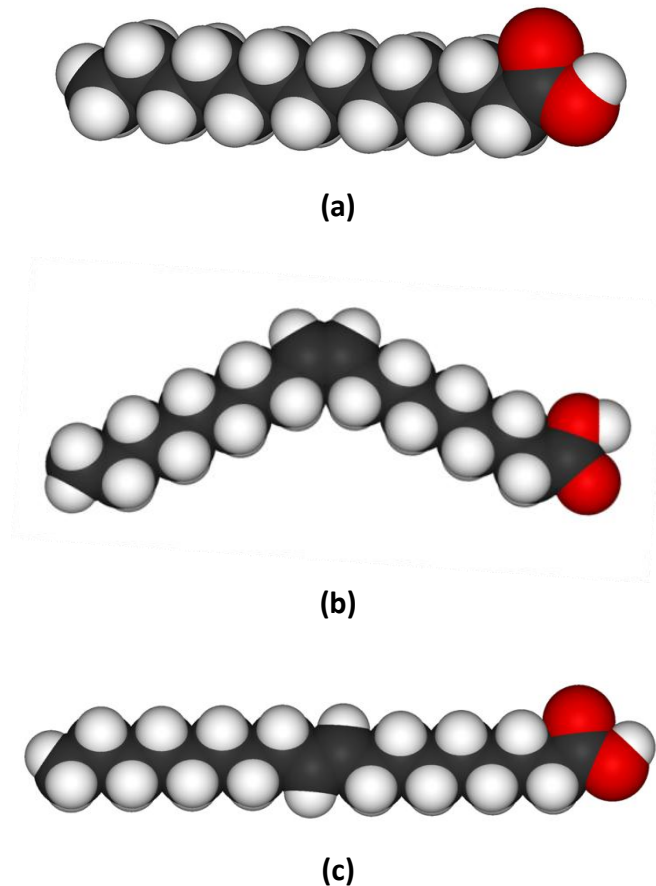
**Figura 1.1.** Molécula de triglicérido

Los ácidos grasos poseen una cadena carbonada, generalmente con un número par de carbonos, la cual puede poseer o no dobles enlaces.

Los triglicéridos poseen propiedades nutricionales únicas y constituyen los nutrientes energéticos por excelencia (la oxidación completa de los ácidos grasos provee 9 kcal/g, cifra que es mayor al doble del valor calórico de carbohidratos y proteínas (4 kcal/g)). Por otro lado, constituyen la reserva energética del organismo acumulándose en el tejido adiposo y actuando asimismo como aislante térmico. Muchos aceites y grasas son fuente de ácidos grasos esenciales (ácido alfa-linolénico y linoleico), los cuales el organismo no es capaz de sintetizar por sí mismo y, por ende, deben ser suministrados por la dieta.

Además de su función nutricional, los aceites y grasas poseen también una función organoléptica en los alimentos, contribuyendo al sabor, color, aroma y textura de los mismos. Es por esto que se encuentran formando parte de una gran cantidad de productos alimenticios (Kodali, 2005).

La diferencia entre la denominación “aceite” y “grasa” se encuentra relacionada con el estado físico de los mismos a temperatura ambiente; los primeros se presentan líquidos, mientras que las grasas se encuentran en estado sólido a dicha temperatura. El grado de insaturación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos presentes en los mismos y su distribución sobre la molécula de glicerol son los principales responsables del punto de fusión de las grasas y aceites. Los ácidos grasos saturados, predominantes en las grasas, poseen una estructura tridimensional lineal (Figura 1.2.), lo cual les permite acomodarse “ordenadamente” en el espacio, resultando sólidos a temperatura ambiente. En el caso de los ácidos grasos insaturados, mayoritarios en los aceites, debe realizarse previamente una distinción debido a la capacidad que poseen los dobles enlaces de los mismos de sufrir isomerización. En la naturaleza, los ácidos grasos insaturados presentes en los aceites y grasas vegetales se encuentran en configuración *cis*. Ésta se encuentra definida por la ubicación de los átomos de hidrógeno de los carbonos involucrados en los dobles enlaces, encontrándose ambos del mismo lado de la cadena carbonada. Esta configuración le confiere a la estructura de la molécula una cierta torsión, dificultando así que puedan ajustarse a una red cristalina, caracterizándose las mismas por poseer bajos puntos de fusión (Kodali, 2005). Como se mencionó, los dobles enlaces pueden, bajo ciertas condiciones, sufrir isomerización, resultando un hidrógeno de cada lado de la cadena carbonada. Esta nueva configuración más simétrica les confiere puntos de fusión intermedios entre los de los ácidos grasos saturados y los insaturados *cis* (Kodali, 2005). En la Figura 1.2. se muestran las estructuras tridimensionales de las tres moléculas descritas, evidenciándose claramente su disposición espacial.



**Figura 1.2.** Estructuras tridimensionales de los ácidos grasos (a) saturado, (b) insaturado *cis* y (c) insaturado *trans*.

La ocurrencia de ácidos grasos *trans* en la naturaleza es mínima, presentándose en grasas de origen animal debido a la biohidrogenación de los aceites llevada a cabo por los rumiantes durante su digestión. La reacción de isomerización posee una energía de activación elevada, motivo por el cual ésta no ocurre fácilmente, siendo necesaria la acción de un catalizador o altas temperaturas para que pueda tener lugar (Kodali, 2005).

Actualmente se encuentra ampliamente comprobado el efecto negativo de las grasas saturadas sobre la salud, éstas aumentan los niveles en sangre de lipoproteína de alta densidad (comúnmente denominado “colesterol malo”) comparado con los ácidos grasos insaturados (Ratnayake y Zehaluk, 2005). Estudios llevados a cabo en los últimos 20 años confirmaron además que los ácidos grasos *trans* comparten también dicha propiedad. Más aún, se demostró que éstos aumentan en mayor medida el

riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, en comparación con los ácidos grasos saturados (Ratnayake y Zehaluk, 2005).

Otra característica que diferencia a los aceites y grasas es su estabilidad oxidativa. Durante la oxidación, los ácidos grasos reaccionan con oxígeno generando compuestos de bajo peso molecular que actúan en detrimento del sabor, aroma y color de los aceites. Por otro lado, se generan compuestos tóxicos y se destruyen ácidos grasos esenciales; resultando una reacción de gran importancia para los aceites en términos de palatabilidad, calidad nutricional y toxicidad (Ratnayake y Zehaluk, 2005). La velocidad de oxidación del ácido oleico (monoinsaturado) es aproximadamente 10 veces mayor que la del ácido esteárico (saturado), mientras que esta misma relación se mantiene para las correspondientes al ácido linoleico (diinsaturado) y oleico (Kodali, 2005). Estas velocidades indican que las grasas saturadas resultan más estables que las insaturadas y, por lo tanto, poseen mayor vida útil.

## 1.2. MODIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La mayoría de los aceites y grasas poseen aplicaciones limitadas en su forma original debido a sus características físico-químicas específicas (Mat Dian et al., 2006). Éstos no presentan las características plásticas adecuadas para ser utilizados como untables (o “spreads”) o incorporados en los alimentos como *shortenings* (productos 100% grasos utilizados principalmente para la elaboración de productos horneados) (Mat Dian et al., 2006). Por otro lado, la utilización de aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados en la formulación de alimentos reduce notablemente su vida de anaquel debido a su propensión a la oxidación.

Es por esto que en los últimos tiempos la industria alimentaria se halla avocada al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan, por un lado, aumentar la estabilidad oxidativa de ciertos aceites y, por otro, conferirles propiedades funcionales mejoradas aumentando su plasticidad en un amplio rango de temperatura.

### 1.2.1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA SOBRE LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS GRASOS

La historia de las margarinas y demás productos grasos ha sido muy bien documentada. El primer producto de este tipo fue la manteca, cuyo origen se remonta a épocas precristianas. Ésta consiste en una emulsión agua en grasa elaborada a partir del batido de la crema de leche, luego de un proceso de maduración y acidificación microbiana de la misma (Shurtleff y Aoyagi, 2004).

La margarina fue desarrollada en 1869 luego de que el Emperador Luis Napoleón III ofreciera un premio a quien pudiera obtener un sustituto económico para la manteca. La demanda de esta última no podía ser satisfecha debido a una merma en el suministro de leche que estaba sufriendo Europa Occidental. Un químico francés, Hippolyte Megè-Mouriès, desarrolló lo que él mismo denominó “oleomargarina”, cuya materia prima constituía la fracción líquida obtenida del prensado en frío de la grasa vacuna. La primera margarina era primitiva con respecto a los estándares actuales. Era muy firme y quebradiza a bajas temperaturas pero nutricionalmente equivalente a la manteca y costaba aproximadamente la mitad (Shurtleff y Aoyagi, 2004).

La grasa vacuna continuó siendo la fuente de grasa para la margarina hasta que la población mundial creció al punto en que el suministro de grasa animal no pudo ser satisfecho. La *hidrogenación parcial*, junto a las mejoras en el refinamiento de los aceites, hicieron posible transformar un aceite líquido en una grasa sólida adecuada para ser utilizada en la elaboración de margarinas o productos alimenticios. Este desarrollo ofreció a los productores un rango más amplio de materias primas que resultaron en una mejora en la textura y plasticidad de los productos aumentando su aceptación por parte de los consumidores (Shurtleff y Aoyagi, 2004).

La depresión del '30, y más tarde la Segunda Guerra Mundial, no propiciaron un contexto adecuado para el desarrollo de nuevos productos. Sin embargo, la guerra aumentó el consumo de margarina como resultado de la escasez de manteca reinante. Durante los años '50, una serie de desarrollos nutricionales y médicos presentaron un nuevo panorama para el negocio de la margarina. El estudio de las dietas de ciertos países, la investigación animal y experimentos dietarios lograron que la palabra

colesterol resultara familiar para los consumidores y la reputación de la manteca disminuyera considerablemente. Por otro lado, estos estudios concluyeron que los aceites con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados disminuían el nivel de colesterol en sangre. La industria reaccionó introduciendo productos conteniendo aceites identificados como altos en poliinsaturados y cambios en la formulación para proveer el máximo nivel de ácidos grasos esenciales (Shurtleff y Aoyagi, 2004).

Sin embargo, restaba aún descubrir la existencia en dichos productos de los ácidos grasos *trans* y su efecto perjudicial sobre la salud. Durante el proceso de hidrogenación, además de producirse la adición de átomos de hidrógeno a los de carbono involucrados en los dobles enlaces de manera de lograr su saturación, tienen lugar reacciones paralelas indeseables, tal como la isomerización de dichos dobles enlaces generando isómeros *trans* (Kodali, 2005). Durante los años '70, ya sospechando los posibles efectos perjudiciales de los mismos sobre la salud, comenzaron a aparecer productos que indicaban la ausencia de dichos isómeros en su composición. Estos productos se formulaban mediante un proceso denominado *blending*. El mismo consiste en mezclar dos aceites o grasas (generalmente un aceite y una grasa) con el objetivo de obtener un sistema con propiedades de fusión específicas. Este proceso resulta realmente atractivo debido a su simplicidad y bajo costo; sin embargo, posee desventajas importantes, tales como la separación de fases que puede tener lugar durante el almacenamiento posterior y la formación de cristales relativamente grandes (Zainal y Affandi Yusoff, 1999; Criado et al., 2007).

Otro proceso utilizado para formular productos grasos es el *fraccionamiento*, el cual consiste en la separación de los aceites y grasas en las diferentes fracciones que los constituyen. Dicha técnica hace uso de las propiedades de fusión y cristalización diferenciales que presentan los diferentes componentes de las grasas y aceites (Metin y Hartel, 2004). Generalmente, este método es utilizado para obtener productos con alto valor agregado o con fines específicos (Metin y Hartel, 2004), siendo también mayormente aplicado a ciertos aceites con características particulares (tal es el caso del aceite de palma, el cual posee la característica distintiva de poseer un alto contenido de triglicéridos constituidos mayormente por ácidos grasos saturados (Gupta, 2007)).

En los últimos años la creciente preocupación respecto a los efectos negativos de los ácidos grasos *trans* sobre la salud ha dado lugar a recomendaciones y regulaciones respecto al consumo de los mismos. En el año 2002 la Junta de Consultores Expertos en Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas de la WHO/FAO recomendó a la población limitar la ingesta de ácidos grasos *trans* a menos del 1% del consumo energético diario (Ratnayake y Zehaluk, 2005). En enero de 2003 Canadá se convirtió en el primer país en requerir la declaración obligatoria del contenido de ácidos grasos *trans* en las etiquetas de los productos envasados (Ratnayake y Zehaluk, 2005). Durante el mismo año, los países miembros del Mercosur firmaron una resolución en ese mismo sentido, la cual fue luego incorporada al Código Alimentario Argentino (C.A.A., [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_V.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf)), entrando en vigencia el 1º de agosto de 2006.

Planteado el panorama descripto respecto a las tecnologías aplicables a la modificación de lípidos y a las normativas actuales en relación a la declaración del contenido de ácidos grasos *trans* (este último aspecto acompañado del creciente interés y avidez de información por parte de los consumidores respecto a la calidad nutricional de los alimentos), la interesterificación de aceites y grasas surge como una alternativa por demás interesante.

### 1.2.2. INTERESTERIFICACIÓN

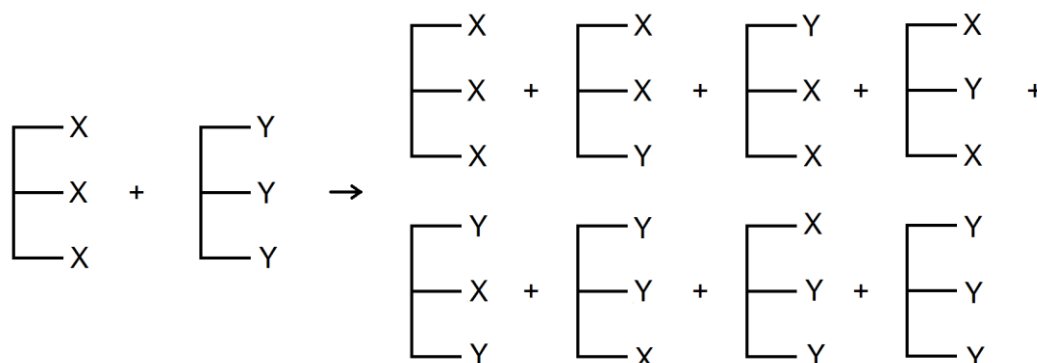
El proceso de interesterificación entre una grasa (sólida) y un aceite (líquido) permite obtener productos grasos semisólidos sin modificar el contenido de ácidos grasos *trans* aportado por los sustratos. Éste consiste en el reacomodamiento de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos de la mezcla inicial obteniendo finalmente un producto con un perfil de triglicéridos diferente del que se partió. Esta reestructuración tiene como consecuencia la modificación de las características físicas y del comportamiento de cristalización de las mezclas reactivas (Zainal y Affandi Yusoff, 1999; Zárubová et al., 2010). Existen también otras aplicaciones del proceso, las cuales están relacionadas con la elaboración de productos con propiedades nutricionales mejoradas, lípidos estructurados reducidos en calorías, etc. (Fernández-



Lafuente, 2010), las cuales no serán objeto de estudio en la presente tesis. En cualquier caso, la composición en ácidos grasos de las mezclas inicial y final se mantiene inalterada debido a que éstos sólo sufren redistribución sobre las moléculas de glicerol presentes.

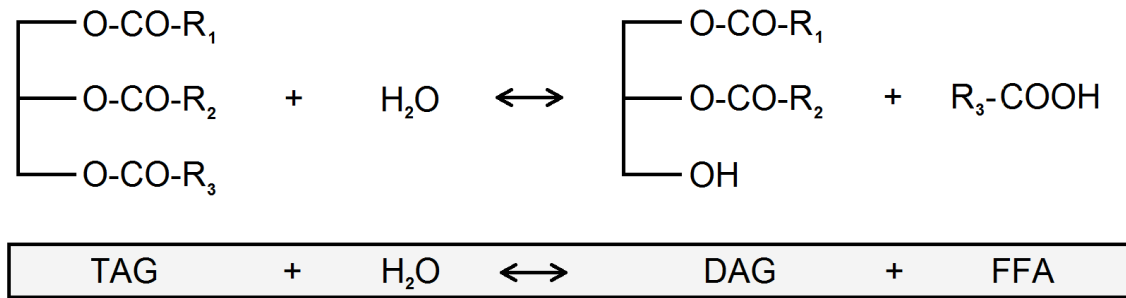
El término *interesterificación* se ha considerado muchas veces sinónimo de *acidólisis*, e incluso se ha confundido con *transesterificación* (Fernández-Lafuente, 2010). Las tres reacciones poseen mecanismos similares actuando sobre diferentes sustratos; en el caso de la transesterificación, también denominada alcoholólisis, los sustratos son triglicéridos y alcoholes, mientras que la acidólisis involucra la reacción entre ácidos grasos libres y triglicéridos. Esta última tecnología comparte objetivos con la interesterificación; aplicándose también en la elaboración de productos grasos con propiedades funcionales mejoradas. Sin embargo, y a pesar de constituir un proceso ampliamente estudiado en la literatura, la interesterificación resulta mucho más atractiva para su aplicación a nivel industrial (Basheer et al., 1995), debido principalmente al menor costo y mayor facilidad de obtención de sus sustratos.

En la Figura 1.3. se presenta un esquema general de la reacción de interesterificación para el cual se consideró una mezcla inicial de dos tipos de triglicéridos monoácidos (constituidos por tres ácidos grasos iguales) con el objetivo de evidenciar los importantes cambios en el perfil de TAG que el proceso es capaz de generar.

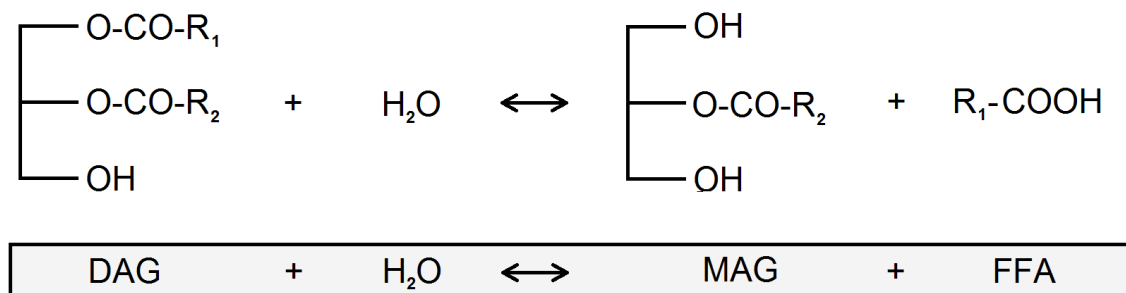


**Figura 1.3.** Esquema general de la reacción de interesterificación.  
(XXX e YYY representan una mezcla de dos tipos de triglicéridos)

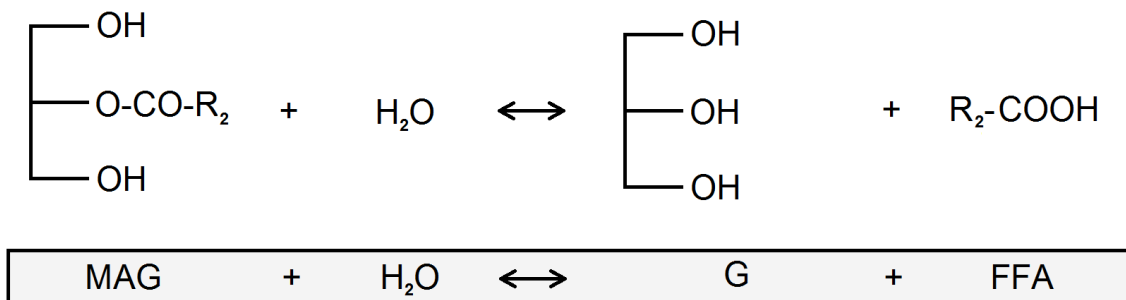
En la Figura 1.4. se detallan las reacciones que pueden tener lugar en un proceso de interesterificación. El primer paso que debe ocurrir es la hidrólisis de los triglicéridos (TAG) para formar diglicéridos (DAG) y ácidos grasos libres (FFA) (Figura 1.4. (a)). Según la estequiometría de la reacción, por cada mol de TAG hidrolizado se produce un mol de DAG y uno de FFA. Luego, la reacción inversa puede ocurrir; esto es, la reesterificación del DAG generado con un FFA para formar nuevamente un TAG (el cual puede ser igual o diferente al original dependiendo del tipo de ácidos grasos involucrados en ambas etapas). Las dos reacciones descritas hasta aquí constituyen la interesterificación en sí. Sin embargo, pueden presentarse reacciones secundarias indeseables, tal como la hidrólisis de los DAG hacia monoglicéridos (MAG) (Figura 1.4. (b)), o incluso, de este último compuesto hacia glicerol (G) (Figura 1.4. (c)). Las consecuencias de las mismas están relacionadas, por un lado, con la disminución del rendimiento de la reacción y, por otro, con la presencia en el producto final de FFA, los cuales disminuyen la vida útil del producto contribuyendo a su oxidación. El desplazamiento de los equilibrios hacia la esterificación con el objetivo de minimizar la ocurrencia de las reacciones secundarias mencionadas se realiza mediante el control del contenido de agua del sistema debido a que éste resulta fácilmente manipulable, operativa y económicamente.



(a)



(b)



(c)

**Figura 1.4.** Esquema general de las reacciones de interesterificación.  
 (a) Reacción principal, (b) y (c) reacciones secundarias.

#### 1.2.2.1. INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA

El proceso de interesterificación puede estar química o enzimáticamente catalizado. En el primer caso, catalizadores químicos, generalmente metóxido de sodio, entran en contacto con la mezcla de sustratos produciendo la redistribución de los ácidos grasos en forma totalmente aleatoria.

Por otro lado, la interesterificación enzimática utiliza lipasas para lograr dicha redistribución. Éstas son enzimas (catalizadores biológicos) que originariamente fueron diseñadas por la naturaleza para catalizar la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres (Paiva et al., 2000). Sin embargo, como se mencionara anteriormente, mediante el control del contenido de agua del sistema es posible promover la ocurrencia de las reacciones de esterificación. La concentración de agua óptima del sistema debe ser lo suficientemente baja de manera de minimizar las reacciones de hidrólisis; sin embargo, la presencia en cierta medida de este solvente es necesaria para mantener la integridad estructural de la enzima y para la generación de los intermediarios necesarios de la reacción (Paiva et al., 2000).

La interesterificación enzimática resulta una alternativa competitiva a la tradicional interesterificación química (Romero et al., 2007). Comparativamente, la interesterificación enzimática posee numerosas ventajas, entre las que puede mencionarse la operación en condiciones más suaves de temperatura y presión, reduciendo la degradación de los productos, los costos operativos y el consumo de energía (Criado et al., 2007; Silva et al., 2009). Además, la interesterificación enzimática consiste en un proceso más “verde” ya que se disminuye la utilización de productos químicos con la consecuente reducción en la polución ambiental (Kim et al., 2008).

Por otro lado, el uso de lipasas en un sistema de reacción natural limita la generación de productos secundarios (Silva et al., 2009) que ocurre durante la interesterificación química, algunos de los cuales modifican el color natural del aceite (List et al., 1977). Éstos se generan a partir de reacciones en las que intervienen, en muchos casos, componentes minoritarios valiosos, tales como fitoesteroles y tocoferoles (De Greyt, 2004; Criado et al., 2007). También los ácidos grasos libres generados durante la interesterificación química pueden reaccionar con el catalizador para producir jabones (List et al., 1977). Las consecuencias de estas reacciones paralelas no deseadas son múltiples: reducción del valor nutricional del producto, mayor tendencia a la oxidación del mismo por disminución de tocoferoles (antioxidantes naturales), mayores pérdidas de aceite (De Greyt, 2004; Kim et al.,

2008) y aumento del número de etapas de postratamiento del producto para su purificación (De Greyt, 2004; Kim et al., 2008).

Por otra parte, las velocidades de reacción para el proceso químico son sustancialmente menores que para el enzimático (del orden de 30 a 60 minutos para alcanzar el equilibrio en el primero y de las horas en el segundo), con lo cual mediante esta última tecnología es posible poseer un mayor control del grado de conversión deseado (Kim et al., 2008).

En adición a las ventajas descritas, una de las características más atractivas que han mostrado poseer ciertas lipasas es su especificidad de posición. Mediante la utilización de lipasas *sn*-1,3 específicas, únicamente los residuos acilo ubicados en las posiciones externas del glicerol resultan reactivos. En los aceites y grasas vegetales los ácidos grasos insaturados se encuentran ubicados preferentemente en la posición central del glicerol (posición *sn*-2), los cuales son más fácilmente absorbidos durante su digestión por parte del consumidor. De esta manera, la utilización de estas enzimas permitiría mantener dicha característica respecto a los sustratos naturales de la reacción, obteniendo grasas más naturales (Mat Dian et al., 2006). Por otro lado, la mencionada selectividad de posición permite obtener productos con menor contenido de subproductos de la reacción respecto al proceso químico, el cual actúa sobre las tres posiciones sin distinción (Criado et al., 2007).

En este punto es necesario mencionar la ocurrencia de una reacción puramente química que se ha demostrado que se presenta en las reacciones de modificación de lípidos (Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010). Ésta consiste en la migración del residuo acilo en posición *sn*-2 a alguna de las dos posiciones externas del glicerol, luego de la hidrólisis por parte de la enzima *sn*-1,3 específica. Este fenómeno, denominado acil migración, el cual se presenta tanto sobre los 1,3-DAG como sobre los 1(3)-MAG, ocurre como consecuencia de la búsqueda de una configuración termodinámicamente más estable. Si los efectos de este mecanismo resultan de importancia, no se podría asegurar la inalterabilidad del perfil ácido en la posición *sn*-2 de la mezcla reactiva inicial, aún mediante la utilización de lipasas *sn*-1,3 específicas.

La inmovilización de lipasas provee ventajas adicionales, relacionadas tanto con la acción de las enzimas como con cuestiones operativas. Con respecto a la primera, la inmovilización generalmente aumenta la termoestabilidad de las lipasas (Zhang et al., 2001). En cuanto a los aspectos operativos, dicho procedimiento facilita la recuperación de los productos y ofrece la posibilidad de reutilizar los catalizadores biológicos o biocatalizadores, disminuyendo los costos operativos (Criado et al., 2007).

Los defensores de la interesterificación química alegan principalmente una única ventaja, la cual reside en que la interesterificación enzimática posee mayores costos operativos. Si bien esto constituyó por mucho tiempo una realidad, a partir del desarrollo del proceso de inmovilización y la aparición de nuevos y más económicos biocatalizadores comerciales, sumado a los menores costos de inversión y menores pérdidas de aceite, actualmente el proceso enzimático resulta altamente competitivo.

### 1.3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La interesterificación química es una tecnología madura a nivel industrial ya que fue desarrollada hace aproximadamente 60 años (List y Reeves, 2005). No ocurre lo mismo con el proceso enzimático, el cual es una tecnología joven, habiéndose desarrollado hace aproximadamente 20 (Xu, 2004). A nivel industrial su implementación data de aún menos años; fue recién en 2004 cuando se comenzó a explotar comercialmente este proceso (List y Reeves, 2005). Transcurrió sólo un año para que en Argentina se instalara la primera planta de interesterificación enzimática, única hasta el momento en Latinoamérica. Ésta funciona en continuo y posee una capacidad de 20 toneladas diarias de aceite interesterificado (Biotimes, [http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006\\_ES.pdf](http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006_ES.pdf)).

El interés general que existe por la utilización como materia prima de los sustratos de reacción utilizados en esta tesis, aceite de soja refinado y este mismo hidrogenado, responde a que éste resulta uno de los dos aceites de mayor producción

mundial, junto con el de palma. En particular, Argentina es el tercer país productor del mundo, luego de Estados Unidos y Brasil (The lipid library, <http://lipidlibrary.aocs.org/market/soybean.htm>).

Hasta el año 2005, en el que se planteó el desarrollo de la presente tesis, se encontraban publicados diversos trabajos referidos al proceso químico utilizando los sustratos mencionados anteriormente (List et al., 1977; Zeitoun et al., 1993; List et al., 1995, 1997; Petrauskaite et al., 1998). En cambio, la información disponible respecto al proceso enzimático era escasa, registrándose un único trabajo en el cual se interesterificaron enzimáticamente aceite de soja refinado y el mismo hidrogenado (Zhang et al., 2004). En ese trabajo se estudió únicamente el comportamiento de los productos respecto al contenido de grasa sólida, parámetro físico utilizado para la evaluación de los mismos.

En los últimos años el número de publicaciones respecto a la interesterificación enzimática de aceites y grasas ha aumentado de manera importante. Sin embargo, al tratarse de reacciones extremadamente complejas y el hecho de que el número de productos generados pueda ser muy grande, que puedan estar ocurriendo simultáneamente tanto procesos enzimáticos como químicos y que las propiedades de las lipasas puedan verse afectadas por pequeños cambios en el medio de reacción o en la preparación enzimática, es necesario estudiar cada sistema en particular, dificultándose de esta manera las comparaciones (Fernández-Lafuente, 2010; Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010).

En cuanto a los antecedentes respecto a estudios cinéticos sobre la reacción de interesterificación enzimática, no se han encontrado hasta la fecha registros de ningún trabajo en el cual se modele la misma; a diferencia de las reacciones de acidólisis y transesterificación, las cuales han sido ampliamente estudiadas (Ortega et al., 2004; Camacho et al., 2007; Magalhães et al., 2010). Por lo tanto, este aspecto de la reacción en estudio supone un desafío interesante.

Respecto al objetivo general de la presente tesis, éste consiste en estudiar la reacción de interesterificación enzimática entre aceite de soja refinado y el mismo hidrogenado para la producción de grasas semisólidas con propiedades funcionales

aptas para su incorporación a diversos alimentos. Se hace especial énfasis en el estudio del comportamiento en el tiempo de la reacción intentando realizar aportes al conocimiento de los posibles mecanismos involucrados en la misma. Cabe destacar en este punto la complejidad que reviste el estudio del sistema en ciertos aspectos respecto a otras reacciones de modificación de lípidos. En el caso de reacciones puras de hidrólisis o esterificación, o incluso en el de la reacción de acidólisis, el estudio del avance de la reacción, como de los mecanismos intervinientes, puede realizarse frecuentemente mediante el seguimiento de ciertas especies en particular. Sin embargo, la similitud entre los sustratos de la reacción en estudio (en términos de residuos acilo a ser intercambiados) y el hecho de que el patrón de los mismos se mantenga invariable dificulta en ocasiones el análisis de los mecanismos que pueden estar actuando durante el desarrollo de la reacción.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- Analizar la influencia de las variables de reacción más importantes sobre el desarrollo de la misma y alguna propiedad física de los productos obtenidos.
- Establecer condiciones de reacción adecuadas de manera de lograr productos con características físicas similares a los comerciales.
- Realizar un estudio del comportamiento cinético de la reacción en diferentes sistemas y condiciones.
- Llevar a cabo el análisis de posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de la reacción y sus consecuencias sobre las composiciones y propiedades de los productos obtenidos.
- Estudiar los posibles mecanismos de acción de las lipasas en la reacción en estudio y desarrollar probables modelos cinéticos capaces de representarlos.



## 1.4. NOMENCLATURA

C.A.A.: Código Alimentario Argentino.

DAG: diglicéridos.

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura.

FFA: ácidos grasos libres.

G: glicerol.

MAG: monoglicéridos.

TAG: triglicéridos.

WHO: Organización Mundial de la Salud.

## 1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Código Alimentario Argentino. [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_V.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf). Último acceso: 20/02/2012.
- Basheer, S.; J. Snape; K. Mogi y M. Nakajima (1995). *Transesterification kinetics of triglycerides for a modified lipase in n-hexane*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(2):231-237.
- Biotimes, [http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006\\_ES.pdf](http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006_ES.pdf). Último acceso: 20/02/2012.
- Camacho, F.; A. Robles; B. Camacho; P. A. González; L. Esteban y E. Molina (2007). *Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor*. Chemical Engineering Science. 62(12):3127-3141.
- Criado, M.; E. Hernández-Martín; A. López-Hernández y C. Otero (2007). *Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat: characterization of the reaction and its products*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 84(8):717-726.
- De Greyt, W. (2004). *Chemical vs enzymatic interesterification*. IUPAC-AOCS Workshop on Fats, Oils & Oilseeds Analyses & Production. Tunis, Tunesia.
- Fernández-Lafuente, R. (2010). *Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62(3-4):197-212.
- Gupta, M. K. (2007). *Practical guide to vegetable oil processing*. Urbana, EEUU, AOCS PRESS.
- Kim, I.-H.; S.-M. Lee; B.-M. Lee; H.-K. Park; J.-Y. Kim; K.-I. Kwon; J.-W. Kim; J.-S. Lee y Y.-H. Kim (2008). *Interesterification of Olive Oil with a Fully Hydrogenated Fat in a Batch Reactor Using Step Changes in Temperature*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(14):5942-5946.

- Kodali, D. R. (2005). *trans fats - chemistry, occurrence, functional need in foods and potential solutions*. trans fats alternatives. D. R. Kodali y G. R. List., Champaign, EEUU, AOCS PRESS.
- List, G.; E. Emken; W. Kwolek; T. Simpson y H. Dutton (1977). "Zero trans" margarines: preparation, structure, and properties of interesterified soybean oil-soy trisaturate blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 54(10):408-413.
- List, G.; T. Mounts; F. Orthoefer y W. Neff (1995). *Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72(3):379-382.
- List, G.; T. Mounts; F. Orthoefer y W. Neff (1997). *Effect of interesterification on the structure and physical properties of high-stearic acid soybean oils*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 74(3):327-329.
- List, G. R. y R. Reeves (2005). *Dietary guidelines, processing, and reformulation for trans reduction*. trans fats alternatives. D. R. Kodali y G. R. List. Champaign., AOCS PRESS.
- Magalhães, S. P.; P. W. C. Falcão; L. S. C. Nogueira y F. L. P. Pessoa (2010). *The synthesis of biodiesel via enzymatic ethanolysis of sunflower and palm oils: Kinetic modeling*. *Chemical Engineering Transactions*. 20:37-42.
- Mat Dian, N.; K. Sundram y N. Idris (2006). *DSC study on the melting properties of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 83(8):739-745.
- Metin, S. y R. Hartel (2004). *Crystallization for nutritionally enhanced fats and oils*. Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing. N. T. Dunford y H. B. Dunford. Champaign, EEUU, AOCS PRESS.
- Ortega, J.; A. López-Hernandez; H. S. Garcia y C. G. Hill Jr (2004). *Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid*. *Journal of Food Science*. 69(1):FEP1-FEP6.
- Paiva, A. L.; V. M. Balcão y F. X. Malcata (2000). *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(3-5):187-204.
- Petrauskaite, V.; W. De Greyt; M. Kellens y A. Huyghebaert (1998). *Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75(4):489-493.
- Ratnayake, W. M. N. y C. Zehaluk (2005). *trans fatty acids in Foods and their labeling regulations*. Healthful lipids. Urbana, EEUU, AOCS PRESS.
- Rodrigues, R. C. y R. Fernández-Lafuente (2010). *Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66(1-2):15-32.
- Romero, M. D.; L. Calvo; C. Alba y A. Daneshfar (2007). *A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane*. *Journal of Biotechnology*. 127(2):269-277.
- Shurtleff, W. y A. Aoyagi (2004). *History of fermented soymilk and its products: history of soybeans and soyfoods: 1100 B.C. to the 1980s*. Lafayette, EEUU, Soyfoods Center.

- Silva, R. C.; L. N. Cotting; T. P. Poltronieri; V. M. Balcão; D. B. de Almeida; L. A. G. Goncalves; R. Grimaldi y L. A. Gioielli (2009). *The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil*. LWT - Food Science and Technology. 42(7):1275-1282.
- The lipid library, <http://lipidlibrary.aocs.org/market/soybean.htm>. Último acceso: 20/02/2012.
- Xu, X. (2004). *Biocatalysis for lipid modifications*. Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing. N. T. Dunford y H. B. Dunford. Champaign, EEUU, AOCs PRESS.
- Zainal, Z. y M. Affandi Yusoff (1999). *Enzymatic interesterification of palm stearin and palm kernel olein*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(9):1003-1008.
- Zárubová, M.; V. Filip; L. Kšandová; J. Šmidrkal y I. Piska (2010). *Rheological and crystalline properties of trans-free model fat blends as affected by the length of fatty acid chains*. Journal of Food Engineering. 99(4):459-464.
- Zeitoun, M.; W. Neff; G. List y T. Mounts (1993). *Physical properties of interesterified fat blends*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 70(5):467-471.
- Zhang, H.; L. Pedersen; D. Kristensen; J. Adler-Nissen y H. Christian Holm (2004). *Modification of margarine fats by enzymatic interesterification: Evaluation of a solid-fat-content-based exponential model with two groups of oil blends*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 81(7):653-658.
- Zhang, H.; X. Xu; J. Nilsson; H. Mu; J. Adler-Nissen y C.-E. Høy (2001). *Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated Thermomyces lanuginosa lipase in a large-scale study*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(1):57-64.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 2.1. MATERIALES

### 2.1.1. SUSTRATOS

Para el diseño experimental planteado en el Capítulo 3 se utilizó un *aceite de soja refinado* (SO), adquirido en un mercado local y producido por la empresa Molinos Río de la Plata S.A. (Buenos Aires, Argentina).

Al momento de llevar a cabo las reacciones de confirmación se utilizó otro lote de aceite de soja refinado elaborado y provisto por la misma firma. Este aceite también se utilizó en el estudio de la cinética de la reacción (Capítulo 4), para lo cual se lo conservó almacenado a temperaturas inferiores a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno.

En el caso del *aceite de soja hidrogenado* (HSO) se utilizaron dos productos de orígenes y características diferentes. El primero, utilizado para el diseño experimental, incluidas las reacciones de confirmación, fue un aceite *parcialmente hidrogenado*, procesado y provisto por un colega. El segundo fue un *aceite de soja totalmente hidrogenado* (FHSO), el cual fue provisto por la firma Calsa S.A. (Buenos Aires, Argentina).

La caracterización química de todos los aceites utilizados se presenta al final de este capítulo.

### 2.1.2. ENZIMAS

Se utilizaron dos lipasas comerciales (triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1): Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM, ambas donadas por Novozymes South America Ltda. (Brasil). Lipozyme RM IM es una enzima de *Rhizomucor miehei* inmovilizada en una resina de intercambio iónico, *sn*-1,3 específica cuyo contenido de agua es de 5.1% (m/m). Lipozyme TL IM es una enzima de *Thermomyces Lanuginosa* inmovilizada en gel de sílice granulada, también ha demostrado tener especificidad *sn*-1,3 y posee un

contenido acuoso de 3.6% (m/m). Las correspondientes hojas de especificación se presentan en el Anexo.

### 2.1.3. REACTIVOS Y SOLVENTES

Todos los estándares utilizados para las determinaciones cromatográficas (1,2,3-trioctadecanol-glicerol, 1,2,3-trihexadecanol-glicerol, 1,2,3-trioctadecadienol-glicerol, 1,2,3-trioctadecanol-glicerol, 1,2,3-trihexadecanol-glicerol, 1,2,3-tridecanol-glicerol, 1,2-distearol-3-palmitol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-2-oleol-glicerol, 1,3-dioleol-2-palmitol-glicerol, 1,2-dilinolel-3-palmitol-rac-glicerol, 1,2-dioleol-3-stearol-rac-glicerol, 1-palmitol-2-oleol-3-linoleol-rac-glicerol, 1,2-distearol-3-oleol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-rac-glicerol, 1-monopalmitol-rac-glicerol, ácido oleico, tetradecano) fueron de pureza mayor al 98% y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU). La piridina utilizada fue de J.T. Baker (Philipsburg, EEUU). El N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y la solución de trifluoruro de boro en metanol (BF<sub>3</sub>-metanol) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza). El n-hexano, tanto de grado cromatográfico como analítico, fue de la marca Dorwil. Los hidróxidos de potasio y sodio fueron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina), mientras que el cloruro y el sulfato de sodio de Anedra (Holanda y España, respectivamente).

### 2.1.4. OTROS

Los tamices moleculares de 3 Å fueron adquiridos a Fluka (Buchs, Suiza).

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. PURIFICACIÓN DEL ACEITE HIDROGENADO

Los aceites hidrogenados tratados con catalizadores a base de níquel (como fue el caso de la grasa utilizada para el diseño experimental (Capítulo 3)) requieren, como post tratamiento, una purificación del producto final con el objetivo de reducir el nivel de dicho metal a valores aceptables. A los fines del trabajo realizado en la presente

tesis, una purificación mediante filtración se consideró suficiente para lograr dicho propósito. Según Costales y Fernández (2009) esta técnica logra reducir la concentración de Ni a niveles tales que se eviten problemas de tipo operativo durante la interesterificación, aunque no logra adjudicarle al producto final la clasificación de grado alimentario.

Se evaluó el filtrado con dos tipos de papel de filtro de diferente tamaño de poro: Whatman grado 1 (11  $\mu\text{m}$ ) y Whatman grado 3 (6  $\mu\text{m}$ ) (Whatman, <http://www.whatman.com/QualitativeFilterPapersStandardGrades.aspx>). El proceso se realizó en estufa a 70°C, de manera de asegurar la completa fusión de la muestra.

El contenido de Ni residual se analizó mediante Espectrometría por Fluorescencia de Rayos X en el Laboratorio de Rayos X de la Unidad de Administración Territorial Bahía Blanca (UAT - CONICET). Mediante la técnica implementada en dicho laboratorio fue posible obtener resultados meramente cualitativos y comparativos. Por lo tanto, junto con los productos de filtrado, se solicitó el análisis de una muestra de aceite refinado para ser utilizado como “patrón” frente al cual se compararon los resultados obtenidos.

### 2.2.2. ÍNDICE DE PERÓXIDOS (PV)

Se realizó una combinación de los métodos IUPAC 2.0501 (1992) y AOCS Cd 8-53 (2006). El método consiste básicamente en pesar 5 g de muestra para luego añadir 30 mL de una solución de ácido acético:cloroformo (3:2, v/v). A continuación agregar 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio, dejar reposar la solución protegida de la luz natural durante 1 minuto, agitando ocasionalmente; y, al cabo del minuto, agregar 30 mL de agua destilada previamente hervida. Titular con una solución de tiosulfato de sodio 0.002 N utilizando solución indicadora de almidón. Por otro lado se realiza una determinación de un blanco de reactivos y se calcula el PV (meq.  $\text{O}_2/\text{kg}$ ) según la Ec. (2-1).

$$\text{PV} = \frac{(\text{S-B}) \text{ N } 1000}{\text{m}} \quad (2-1)$$

Donde: S = volumen de sol. tituladora utilizada para la muestra (mL).

B = volumen de sol. tituladora utilizada para el blanco (mL).

m = masa de muestra utilizada (g).

### 2.2.3. VALOR DE p-ANISIDINA (p-AV)

Dicho parámetro se determinó mediante el Método Oficial AOCS Cd 18-90 (2006), el cual consiste brevemente en pesar de 0.5 a 4.0 g de muestra, llevar a 25 mL con isooctano y medir la absorbancia de la solución a 350 nm por espectrofotometría, utilizando como blanco el solvente mencionado. Luego tomar exactamente 5 mL de la solución de muestra por un lado y el mismo volumen de solvente por otro. Agregar a cada uno exactamente 1 mL de una solución de p-anisidina (25 g/100 mL de solución de ácido acético glacial) y agitar. Luego de exactamente 10 min repetir las mediciones de absorbancia a la misma longitud de onda, ahora utilizando la solución de isooctano + p-anisidina como blanco. El cálculo del p-AV se realiza mediante la Ec. (2-2).

$$p-AV = \frac{25 (1.2 AS - Ab)}{m} \quad (2-2)$$

Donde: As = absorbancia de la solución de muestra luego de reaccionar con la p-anisidina.

Ab = absorbancia de la solución de muestra.

m = masa de muestra utilizada (g).

### 2.2.4. ÍNDICE DE IODO (IV)

Se calculó a partir de la composición acídica de las muestras según el Método Oficial AOCS Cd 1c-85 (2006).

### 2.2.5. CONTENIDO DE AGUA

El contenido de agua de ambos tipos de enzimas y de los sustratos de las reacciones se llevó a cabo utilizando un titulador Karl Fischer Mettler DL 18 (Mettler Toledo, Zürich, Suiza) según el Método AOCS Ca 2e-84 (2006) y procedimientos



detallados en el manual del instrumento. Para el análisis del aceite hidrogenado se evaluó el poder solvente de varias mezclas cloroformo-metanol. El alcohol debe estar presente en cualquier determinación de Karl-Fischer, mientras que el cloroformo se eligió debido a la alta solubilidad que presentan las grasas en él. Finalmente se optó por realizar una solución de 35 mL de cloroformo + 20 mL de metanol, proceder a titularla para llevar a cero el instrumento y luego agregar una solución de 3 g de grasa en 12 mL de cloroformo, el cual se encontraba previamente titulado. El contenido de humedad en el aceite se realizó solubilizando la muestra (aprox. 10 g) en 100 mL de una solución 30:70 (% v/v) de cloroformo:metanol, solución recomendada por el fabricante para determinaciones en grasas comestibles.

En el caso de las enzimas inmovilizadas, el solvente utilizado fue metanol puro y se fraccionaron muestras de aproximadamente 0.25 g.

El reactivo de Karl-Fischer se encuentra disponible comercialmente en tres concentraciones. Se optó por la solución de mayor concentración para todas las determinaciones, la cual es capaz de titular 5 mg de agua/mL de dicha solución.

#### 2.2.6. DENSIDAD

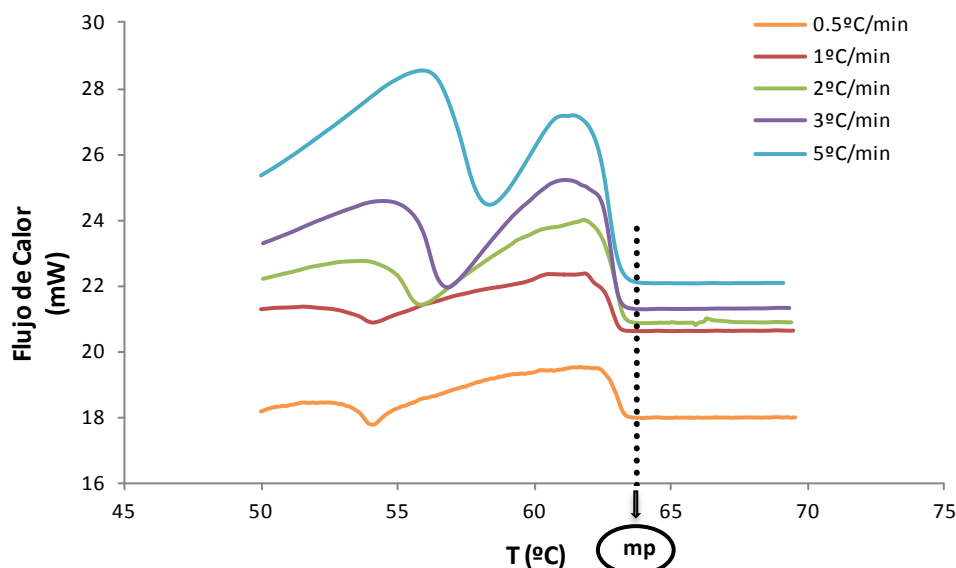
La densidad de ambos sustratos fue determinada por picnometría de acuerdo al Método IUPAC 2.101 (1992). Esta propiedad se utilizó para el cálculo del volumen de la mezcla de reacción, necesario para la determinación de las concentraciones molares de los TAG de los productos de interesterificación. Por lo tanto las determinaciones se llevaron a cabo a 70°C, temperatura media de las utilizadas en las reacciones sin presencia de solvente (65, 70 y 75°C). El error cometido al no considerar el efecto de la temperatura sobre la densidad de ambos sustratos en los sistemas con solvente (55 y 60°C) fue despreciable ya que el volumen de los mismos representó el 25% del volumen total del sistema de reacción.

La densidad de los ácidos grasos y glicéridos parciales se estimó de acuerdo a valores reportados en la bibliografía (Cedeño González et al., 1999; Graciani-Constante, 2006).

### 2.2.7. PUNTO DE FUSIÓN (mp)

Las muestras fueron analizadas mediante Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un calorímetro modelo Pyris 1 (Perkin-Elmer, Waltham, EEUU) adaptando el Método Oficial AOCS Cc1-25 (2006). Éste consiste en colocar la muestra en el interior de un capilar de vidrio de 1 mm de diámetro interno, mantener a 4 - 10°C por 16 h y posteriormente sumergirlo en un baño de agua e ir aumentando la temperatura del mismo a una velocidad de 0.5°C/min. La determinación del punto de fusión (mp) debe ser realizada por simple inspección visual de la muestra registrando la temperatura a la cual ésta se torna totalmente translúcida. En la presente tesis se decidió utilizar la técnica de DSC con el objetivo de minimizar la apreciación subjetiva del analista y lograr de esta forma mayor precisión en las determinaciones. Por otro lado, la técnica de DSC es la más utilizada para llevar a cabo análisis térmicos en el área de los aceites y grasas (Santana et al., 2008).

El punto de fusión para la técnica utilizada se consideró como aquella temperatura a partir de la cual el termograma mostró una línea recta y horizontal cuando la muestra se sometió a una velocidad de calentamiento constante, desde 10°C hasta 65°C. Se eligió este rango de temperaturas ya que las muestras se encontraban a temperatura de refrigeración (4 - 10°C) en el momento de comenzar con el análisis y se sabía que el mp de ninguna de las muestras superaría el límite superior debido a que la grasa poseía un punto de fusión de 64.1°C. Se evaluaron diferentes gradientes de temperatura (0.5 - 5°C/min) sobre una misma muestra con el fin de evaluar la posibilidad de trabajar a mayores velocidades, con la consecuente reducción de los tiempos de análisis (Figura 2.1.). A pesar de que la forma de los perfiles obtenidos no se mantuvo para todas las velocidades, los mp determinados resultaron ser comparables en todo el rango estudiado; con lo cual se decidió optar por el mayor gradiente (5°C/min).



**Figura 2.1.** Análisis por DSC de una muestra de aceite de soja hidrogenado. Termogramas obtenidos variando la velocidad de calentamiento.

La preparación de la muestra consistió, en primer lugar, en realizar una deacidificación de la misma de manera de eliminar los ácidos grasos libres (FFA) generados durante la reacción de interesterificación, purificación que también se realiza a nivel industrial (Costales y Fernández, 2009). Por otro lado, la eliminación de dichos subproductos permite obtener picos mejor definidos (Sathivel et al., 2008) y facilitar la lectura de la temperatura de fusión. La deacidificación de las muestras se realizó según Lee y Akoh (Lee y Akoh, 1998). Las técnicas de muestreo y templado previo al análisis son factores de importancia a la hora de obtener curvas de DSC (Santana et al., 2008), es por esto que se tuvo especial cuidado en lograr una estandarización del pretratamiento de las muestras de manera de asegurar idéntica historia térmica para la totalidad de las mismas. El procedimiento consistió en colocar de 5 a 8 mg de muestra en cápsulas de aluminio y luego trasladarlas a estufa a 70°C por una hora, de manera de asegurar la eliminación de posibles burbujas de aire que pudieran haber quedado atrapadas en el interior de las mismas. Posteriormente se refrigeraron en heladera (4 - 10°C) por un mínimo de 16 h (AOCS Cj 1-94, (2006)). Como blanco se utilizó una cápsula de aluminio vacía.

### 2.2.8. ANÁLISIS DEL PERFIL ACÍDICO EN POSICIÓN *sn*-2

La determinación de la composición acídica de la posición *sn*-2 de los glicéridos de las muestras de interesterificación se realizó utilizando la reacción de la lipasa pancreática, siguiendo la norma AOCS Ch 3-91 (AOCS, 2006) con modificaciones. Dicha norma recomienda partir de 100 mg de muestra deacidificada (purificación necesaria para favorecer la reacción de hidrólisis, llevada a cabo según Lee y Akoh (1998)) y realizar la reacción de la lipasa pancreática a 40°C.

En este caso se optó por utilizar menor cantidad de muestra de partida (40 mg antes de la etapa de deacidificación) con la intención de reservar material para análisis subsecuentes, práctica también utilizada en otros trabajos (López-López et al., 2001; Li et al., 2010).

Por otra parte, debido a que ciertos productos de reacción de interesterificación poseen puntos de fusión por encima de 40°C, se decidió realizar la reacción de la lipasa pancreática a 52°C (temperatura a la cual se determinó que una muestra compuesta por 50% de aceite y 50% de grasa, en hexano, se encuentra totalmente disuelta).

En el caso del aceite de soja hidrogenado, dado su alto punto de fusión, su perfil acídico en posición *sn*-2 fue calculado teóricamente mediante balances molares a partir de las distribuciones determinadas experimentalmente para ciertas mezclas de sustratos.

La técnica consistió brevemente en colocar las muestras, previamente deacidificadas, en tubos de reacción roscados para ser solubilizadas en hexano. Los mismos se colocaron en un baño calefaccionado con agitación magnética, a los cuales, luego de lograr su atemperamiento y total disolución, se agregó solución buffer. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis haciendo uso de la lipasa pancreática y se colectaron los productos de reacción. Éstos fueron separados por cromatografía de capa fina, colectándose la fracción de 2-MAG para ser metilada (ver apartado 2.2.9.1.1.) y analizada mediante cromatografía gas-líquido (CGL).

## 2.2.9. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

### 2.2.9.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS *CIS/TRANS*

#### 2.2.9.1.1. DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA

La composición acídica se determinó mediante cromatografía gas-líquido (CGL) previa transformación de los ácidos grasos (FA) en sus ésteres metílicos (FAMES). Para llevar a cabo este paso se evaluaron dos técnicas diferentes de derivatización: la primera comúnmente denominada “metilación en caliente” y la segunda “metilación en frío”, ambas descritas por el Método Oficial AOCS Ce 2-66 (2006). La primera conlleva una mayor complejidad analítica debido a la necesidad de trabajar a elevadas temperaturas de manera de lograr la ebullición de la mezcla reactante, mientras que la segunda se desarrolla a temperatura ambiente. Según la mencionada norma, el primer método es aplicable a la mayoría de las grasas y aceites, mientras que la aplicación del segundo se encuentra limitada a aquellas muestras con un valor de acidez inferior a las 2 unidades.

Sin embargo, ciertos autores prefieren y recomiendan enfáticamente la técnica “en frío” por diversos motivos. Entre ellos se puede mencionar el riesgo de generación de isómeros *trans* que pueden acarrear las condiciones extremas de la técnica “en caliente” (León-Camacho et al., 1999); la elevada toxicidad del principal reactivo involucrado en este método, el cual consiste en una mezcla de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) y metanol, toxicidad que incluso se ve agravada por el calentamiento de dicho reactivo (Ken'ichi y Yumeto, 2010) y la limitada vida útil del mismo, aún en condiciones de refrigeración (Christie, 1989). En cuanto a esta última razón, Christie sostiene que la utilización de soluciones viejas o muy concentradas frecuentemente deriva en reacciones secundarias y en la pérdida de apreciables cantidades de ácidos grasos poliinsaturados.

En consecuencia, se propuso derivatizar una muestra de aceite de soja refinado y una del mismo aceite hidrogenado por ambos métodos y comparar los resultados obtenidos.

En el caso del aceite hidrogenado no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ninguno de sus FAMES, mientras que para el aceite refinado, el cual poseía una concentración mayor de FFA, sólo para algunos compuestos (4 compuestos no identificados; C16:1; C18:1, 9t; C18:2, 9t-12t; C18:2, 9c-12t; C18:2, 9t-12c), cuyos contenidos medios individuales resultaron menores a 0.4%, se obtuvieron diferencias significativas (ver apartado 2.3.1.). En consecuencia, se decidió tomar como método de derivatización de los ácidos grasos a la metilación “en frío”.

#### 2.2.9.1.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Los ácidos grasos *trans* de los aceites parcialmente hidrogenados son mezclas complejas de diversos isómeros geométricos y de posición. Los picos cromatográficos de algunos isómeros *cis* y *trans* pueden superponerse y, por consiguiente, impedir la correcta determinación de la composición ácida de dichos productos (Wolff et al., 1998; Ratnayake, 2001; Ratnayake et al., 2002; Ratnayake, 2004a). Las posibles consecuencias de una incorrecta identificación de un pico eluyendo junto a otro (u otros) pueden ser dos: por un lado la pérdida de información respecto a la existencia y concentración de dichos picos y, por otro, el posible “corrimiento” en la identificación de los picos eluyendo a tiempos mayores, consecuencia que reviste sin dudas mayor gravedad.

A lo expuesto se agrega la ausencia de estándares auténticos para una correcta y completa identificación, convirtiendo a la determinación de ácidos grasos *trans* en un verdadero desafío. Sin embargo, a lo largo de los años se han desarrollado diversos métodos eficientes y confiables para llevar a cabo dichos análisis (Ratnayake, 2004b). La aplicación de CGL acoplada a un detector de ionización de llama (FID) y a columnas capilares con fases estacionarias altamente polares de cianoalquil polisiloxanos resulta la herramienta analítica más conveniente para la determinación de los ácidos grasos (Ratnayake, 2004a). Por otro lado, la utilización de columnas de 100 m de largo minimiza la superposición de los ácidos grasos *cis* y *trans* (Wolff y Bayard, 1995; León-Camacho et al., 1999; Ratnayake et al., 2002; Ratnayake, 2004a).

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo gaseoso de la serie 4890D (Agilent, Hewlett-Packard, Wilmington, EEUU) equipado con una columna capilar de sílica fundida modelo SP-2560 (fase estacionaria: Poli(biscianopropil siloxano), 100 m x 0.25 mm de diámetro interno (ID) x 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor de película) (Supelco Inc., California, EEUU).

Dicha columna es considerada una de las dos columnas capilares (junto con la CP-Sil 88 de Chrompack) con mejor desempeño en la separación de isómeros *cis-trans* (Ratnayake et al., 2002). Incluso en dicho artículo se demuestra que la fabricada por Supelco posee una ligera ventaja respecto a la de Chrompack.

En cuanto al método utilizado, se evaluaron cuatro diferentes con el objetivo de optimizar la separación de los isómeros *cis-trans*, especialmente en la zona de C18:1. En la Tabla 2.1. se resumen las condiciones de análisis para cada uno de ellos. El gas carrier utilizado en todos los casos fue  $\text{H}_2$ , el cual posee mayor eficiencia que el He ya que puede ser utilizado en un mayor rango de caudales sin pérdida de resolución (Collison, 2006). La identificación de ciertos FAMES se realizó por comparación con los tiempos de retención de estándares auténticos (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-hromatography/fatty-acid-methyl-ester/fame-capillary-columns/fame-mix-100m-sp2560.html>; Restek, <http://www.restek.com/pdfs/59584B.pdf>); mientras que en los casos en que no se contaba con el estándar correspondiente (en particular para los isómeros *trans*), se recurrió a la comparación con cromatogramas publicados en diversos artículos sobre el tema (Wolff, 1998; León-Camacho et al., 1999; Alonso et al., 2000; Ratnayake et al., 2002; Ratnayake, 2004a; Ratnayake et al., 2006).

Los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación del Método Oficial AOCS Ce 1h-05 (2006) (operación isotérmica a 180°C), con el cual se consiguió lograr una separación casi total de los isómeros *cis-trans*, resultado que concuerda con los obtenidos por Ratnayake et al. (2002) y Collison (2006) (Figura 2.2.). Tanto en el primer trabajo citado como en la presente tesis no fue posible resolver los picos correspondientes a los isómeros C18:1, (13t + 14t) y C18:1, 15t de ciertos isómeros *cis*. El segundo pico representó un porcentaje mínimo de la muestra (aprox. 1% (m/m)),

mientras que la concentración del primero ya no resultó despreciable (4.7% (m/m)). Ratnayake (2004a) sugiere combinar la técnica de cromatografía de capa fina con nitrato de plata (Ag-TLC) con CGL si se pretende separar dichos isómeros. Se intentó aplicar dicha técnica, aunque sin los resultados esperados ya que no fue posible resolver los picos que presentaban superposición al aplicar únicamente CGL. A pesar de dichos resultados, se consideró aceptable el error cometido al calcular el contenido de ácidos grasos *trans* a partir del análisis de CGL, ya que el objetivo de dicha determinación en el marco de la presente tesis fue de carácter meramente descriptivo, aplicándose únicamente a los sustratos de la reacción para su caracterización. La asignación del porcentaje de área de dichos pares críticos se realizó considerando que la relación C18:1-t/C18:1-c calculada para el resto de los ácidos grasos monoinsaturados presentes en la correspondiente muestra se mantenía constante.

La cuantificación se llevó a cabo con el método de porcentaje de área y la adquisición de los datos e integración de los cromatogramas se realizó mediante el software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, 1998).



**Tabla 2.1.** Condiciones cromatográficas de diferentes métodos analíticos aplicados a la cuantificación de ácidos grasos discriminando por isomería *cis-trans*.

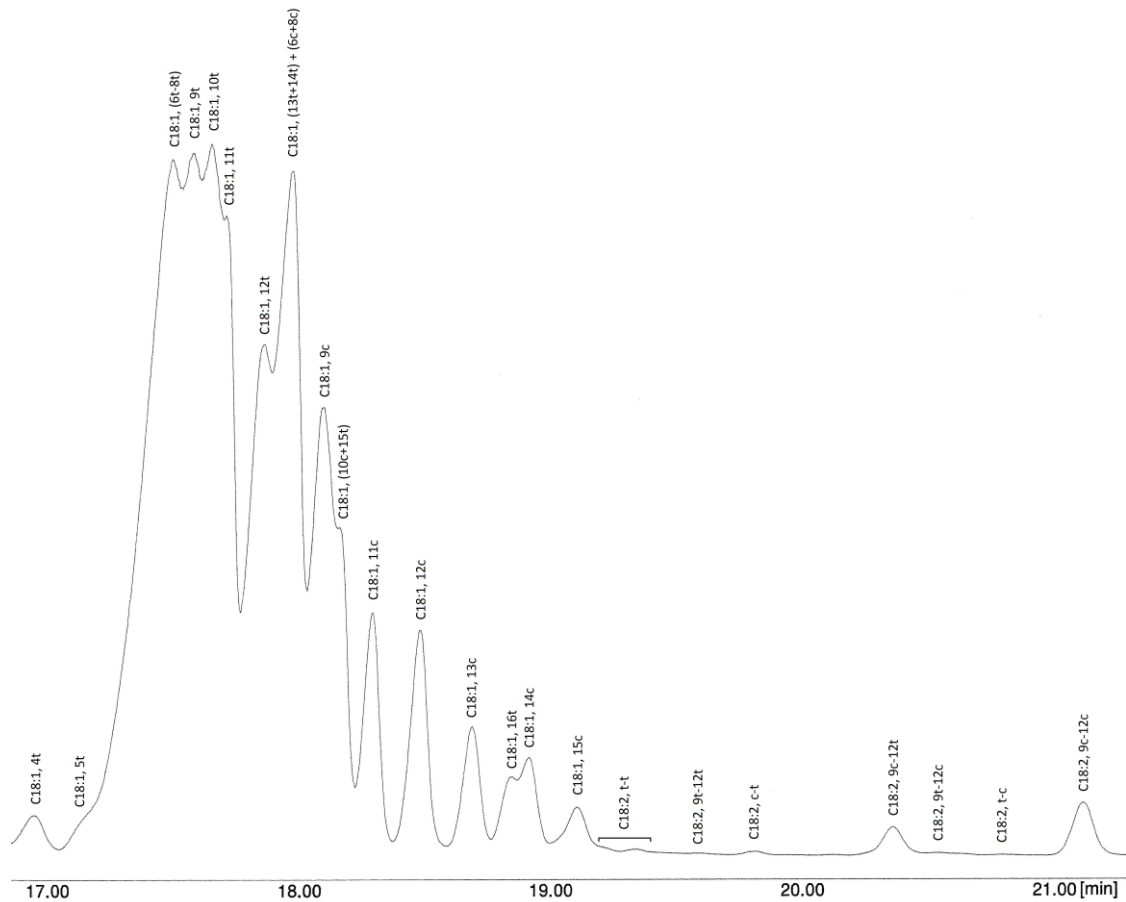
Fuente	Temperaturas			Presión en la cabeza de la columna (psi)	Relación de split	Velocidad del gas carrier <sup>C</sup> (cm/s)	Tiempo de análisis (min)
	Horno (°C)	Detector <sup>A</sup> (°C)	Inyector <sup>B</sup> (°C)				
Método Oficial AOCS Ce 1h-05 (2006)	180°C	250	250	25.0	100:1	26.0	45
Catálogo Supelco (2007 - 2008)	140°C (5 min) @ 4°C/min 240°C (15 min)	260	250	23.5	100:1	20.0	45
Fernández (2006)	150°C @ 1°C/min 210°C (20 min)	250	225	18.0	100:1 <sup>α</sup>	15.3	80
León Camacho et al. (1999)	170°C (20 min) @ 3°C/min 200°C (10 min)	250	200	19.0	100:1 <sup>α</sup>	15.7	40

<sup>A</sup>Tipo de detector: FID (detector de ionización de llama).

<sup>B</sup>Tipo de inyector: Split/splitless en modo split.

<sup>C</sup>Gas carrier: H<sub>2</sub>.

<sup>α</sup>Condición no especificada.



**Figura 2.2.** Cromatograma de la zona de FAMES de C18:1 y C18:2 del aceite vegetal hidrogenado utilizado para el diseño experimental (Capítulo 3). Condiciones cromatográficas según Método Oficial AOCS Cd 1h-05 (2006) (Tabla 2.1.).

## 2.2.9.2. DETERMINACIÓN CONJUNTA DE FFA, MAG, DAG Y TAG POR CGL

### 2.2.9.2.1. DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA

Los grupos hidroxilo libres de los monoglicéridos (MAG) y diglicéridos (DAG) deben ser sililados de manera de incrementar sustancialmente la volatilidad y estabilidad térmica de estos compuestos. Este procedimiento asegura además excelentes formas de pico, bajos límites de detección y mejora considerablemente la robustez del método cromatográfico (Plank y Lorbeer, 1995). En este trabajo se implementó el procedimiento seleccionado por Plank y Lorbeer (1995), quienes desarrollaron cuatro métodos para la sililación completa de muestras de glicéridos parciales, debido a su simplicidad y rapidez. El mismo consiste en agregar a la muestra

a sililar MSTFA como agente derivatizante y piridina como catalizador de la reacción. El agregado de piridina permite llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente sin necesidad de la aplicación de calor. El tiempo de reacción es de sólo 15 minutos.

#### 2.2.9.2.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso de la serie 4890D (Agilent, Hewlett-Packard; Wilmington, EEUU) equipado con detector FID e inyector split/splitless. La columna capilar elegida para llevar a cabo los análisis fue la MXT-65TG (0.25 mm (ID) x 0.10 µm de espesor de película x 30 m de largo; Restek, Bellefonte, EEUU). Se trata de una columna metálica con una fase estacionaria altamente polar (65% difenil/35% dimetil polisiloxano), probada especialmente para la determinación de triglicéridos (TAG), los cuales son resueltos por grado de insaturación y número de carbonos (Restek, <http://www.restek.com/catalog/view/1386>). Cabe aclarar que la misma no logra la separación de los diferentes isómeros de posición de los mencionados glicéridos. La química de su fase estacionaria y la resistencia mecánica que ofrece su estructura metálica le confieren una alta resistencia térmica (370°C), condición fundamental para el análisis de compuestos de tan elevados pesos moleculares.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis conjunto de los cuatro componentes mayoritarios de los aceites y grasas utilizados en esta tesis (FFA, MAG, DAG y TAG) se establecieron realizando una fusión entre dos técnicas implementadas en primera instancia (Tabla 2.2.). La primera tenía como objetivo la determinación de los productos secundarios de la reacción de interesterificación (FFA, MAG y DAG) y se desarrolló de acuerdo a Gutiérrez-Ayesta et al. (2007). En el caso del método implementado para la determinación de TAG, éste se desarrolló proponiendo diferentes condiciones operativas y llevando a cabo las correspondientes pruebas para finalmente seleccionar el conjunto de condiciones que optimizaron la separación de los compuestos a determinar. Las propuestas surgieron a partir de una búsqueda bibliográfica, la cual incluyó publicaciones (Rezanka y Mares, 1991; Buchgraber et al., 2000, 2004), Normas (IRMM Method EUR 20831 EN (Buchgraber y Anklam, 2003); Método Oficial AOCS Cd 11b-91 (2006)) y un catálogo de columnas cromatográficas (Restek, <http://www.chromspec.com/pdf/e/rk86.pdf>).

**Tabla 2.2.** Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuestos mayoritarios de aceites y grasas refinados.

	Variable	Condición
Temperaturas (°C)	Horno	40°C (4 min) @ 25°C/min 350°C @ 0.2°C/min 360°C
	Detector <sup>A</sup>	380
	Inyector <sup>B</sup>	360
	Presión en la cabeza de la columna (psi)	12.5
	Relación de split	60:1
	Velocidad del gas carrier <sup>C</sup> (cm/s)	41
	Largo de columna (m)	30

<sup>A</sup>Tipo de detector: FID.

<sup>B</sup>Tipo de inyector: Split/splitless en modo split.

<sup>C</sup>Gas carrier: H<sub>2</sub>.

El sistema de adquisición de datos y la integración de los cromatogramas se realizó utilizando el software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, 1998).

#### 2.2.9.2.3. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

En cuanto a la técnica de cuantificación, en este caso no fue posible aplicar el método de porcentaje de áreas debido a que la respuesta del detector difería con cada uno de los analitos involucrados. Como consecuencia, debieron calcularse necesariamente factores de respuesta (RF) para cada uno de los compuestos analizados.

Se utilizó el método de múltiples puntos de estándar interno (IS). La utilización de un estándar interno logra aumentar en gran medida la precisión de las determinaciones debido a que permite compensar posibles variaciones en el volumen inyectado. Generalmente dichas fluctuaciones representan un error significativo en cromatografía gaseosa si se utiliza inyección manual (Poole, 2003).

Por otro lado, el estándar interno debe ser un compuesto que reúna las siguientes características (Poole, 2003):

- Ser de alta pureza, estable y no debe reaccionar con los compuestos de la muestra.
- No debe estar presente en la muestra a analizar y debe separarse completamente del resto de los componentes de la misma.
- Su comportamiento debe ser comparable al de los compuestos de interés, por lo tanto debe poseer propiedades físicas y químicas similares.
- Debe poseer preferentemente un factor de respuesta al detector similar al del analito y estar presente en concentraciones similares.

Raramente se encuentra un compuesto capaz de reunir la totalidad de dichas condiciones, particularmente cuando se utiliza un único estándar para el análisis de mezclas multicomponentes cuyos compuestos varían en concentración e identidad química (Poole, 2003).

El método de múltiples puntos de estándar interno consiste en realizar determinaciones a diferentes concentraciones del analito de interés manteniendo constante la correspondiente al estándar interno elegido. De esta forma se construyen curvas de calibración que definen la relación entre el área del analito (A) y su concentración (Conc), ambas referidas al IS.

En caso de que las curvas resulten ser rectas, el método de múltiples puntos se convierte en el “método de único punto de estándar interno”, y el cálculo de un único factor de respuesta relativo ( $RRF = (A_{\text{analito}}/A_{\text{IS}})/(Conc_{\text{analito}}/Conc_{\text{IS}})$ ) resulta suficiente para la cuantificación del analito en cuestión.

CONSTRUCCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

- *FFA, MAG y DAG*

El estándar interno seleccionado en el caso de los FFA fue el tetradecano (TD) y las curvas de calibración se construyeron tomando como ácido graso de referencia al ácido oleico (O). De esta forma se consideró que todos los ácidos grasos presentes en las muestras a analizar poseían igual RRF que dicho compuesto. Por otro lado, ambos grupos de glicéridos parciales se analizaron considerando a la tricaprina (CCC) como estándar interno (Gutiérrez-Ayesta et al., 2007) y a la monopalmitina (MP) y dipalmitina (PP) como estándares de referencia para los MAG y DAG, respectivamente.

A continuación se especifican las soluciones utilizadas en la construcción de las correspondientes curvas de calibración:

Soluciones madre para análisis de FFA, MAG y DAG

*Sción. de CCC* (10.6 mg CCC/mL): 10.7 mg de CCC + 1 mL de piridina.

*Sción. de TD* (10.6 mg TD/mL): 10.7 mg de TD + 1 mL de piridina.

*Sción. concentrada de O* (19.5 mg O/mL): 20 mg de O + 1 mL de piridina.

*Sción. de O* (5.41 mg O/mL): 20  $\mu$ L de sción. concentrada de O + 52.24  $\mu$ L de piridina.

*Sción. diluida de O* (1.71 mg O/mL): 10  $\mu$ L de sción. concentrada de O + 104.27  $\mu$ L de piridina.

*Sción. concentrada de MP y PP* (19.1 mg (MP/PP)/mL): 20 mg de MP + 20 mg de PP + 1 mL de piridina.

*Sción. de MP y PP* (5.41 mg (MP/PP)/mL): 20  $\mu$ L de sción. concentrada de MP y PP + 50.61  $\mu$ L de piridina.

*Sción. diluida de MP y PP* (1.71 mg (MP/PP)/mL): 10  $\mu$ L de sción. concentrada de MP y PP + 101.7  $\mu$ L de piridina.

Soluciones a inyectar para curvas de calibración de FFA, MAG y DAG (entre paréntesis se especifica la relación concentración de estándar/concentración de IS)

*Solución 1:* 6.42  $\mu$ L de sción. de CCC.  
 (0.10) 6.42  $\mu$ L de sción. de TD.  
 3.98  $\mu$ L de sción. diluida de O.  
 3.98  $\mu$ L de sción. diluida de MP y PP.

60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

*Solución 2:* 6.68  $\mu\text{L}$  de solución. de CCC.  
(0.41) 6.68  $\mu\text{L}$  de solución. de TD.  
5.40  $\mu\text{L}$  de solución. de O.  
5.40  $\mu\text{L}$  de solución. de MP y PP.  
60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

*Solución 3:* 7.74  $\mu\text{L}$  de solución. de CCC.  
(0.72) 7.74  $\mu\text{L}$  de solución. de TD.  
10.98  $\mu\text{L}$  de solución. de O.  
10.98  $\mu\text{L}$  de solución. de MP y PP.  
60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

*Solución 4:* 6.35  $\mu\text{L}$  de solución. de CCC.  
(1.04) 6.35  $\mu\text{L}$  de solución. de TD.  
3.57  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de O.  
3.65  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de MP y PP.  
60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

*Solución 5:* 6.59  $\mu\text{L}$  de solución. de CCC.  
(1.35) 6.59  $\mu\text{L}$  de solución. de TD.  
4.82  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de O.  
4.93  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de MP y PP.  
60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

*Solución 6:* 6.84  $\mu\text{L}$  de solución. de CCC.  
(1.66) 6.84  $\mu\text{L}$  de solución. de TD.  
6.16  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de O.  
6.30  $\mu\text{L}$  de solución. concentrada de MP y PP.  
60  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

Las soluciones fueron preparadas por duplicado e inyectadas por triplicado, siendo el volumen de inyección de 1.5  $\mu\text{L}$ .

Para los tres compuestos considerados se obtuvieron rectas de calibración. En el caso de los FFA, tal como se esperaba, el valor de su factor de respuesta relativo resultó cercano a la unidad ( $\text{RRF}_{\text{FFA}} = 0.98$ ,  $R^2 = 0.9993$ ), mientras que las pendientes

correspondientes a los MAG y DAG se ubicaron en los siguientes valores: 1.57 ( $R^2 = 0.9996$ ) para los MAG y 1.10 ( $R^2 = 0.9995$ ) en el caso de los DAG. El hecho de que dichos factores de respuesta relativos se ubicaran por encima de las 0.5 unidades aseguraría la ausencia de descomposición o pérdidas en el sistema cromatográfico (Método Oficial AOCS Cd 11b-91 (2006)).

- TAG

Los factores de respuesta relativos calculados para estándares de TAG con diversos grados de insaturación, considerando a la tripalmitoleína (PoPoPo) como estándar interno, resultaron diferir sustancialmente entre sí. En consecuencia, se decidió construir curvas de calibración para cada uno de los TAG presentes en las muestras a analizar. Se dispuso de 9 estándares comerciales y se identificaron como máximo 25 picos cromatográficos en los productos de interesterificación. A partir de dichos estándares se ajustaron superficies de calibración debido a la incorporación de una tercera variable, el tiempo de retención relativo (trr) definido por la Ec. (2-3) (Carelli y Cert, 1993; Método Oficial AOCS Ce 5b-89 (2006)).

$$\text{trr} = \frac{\text{tr}_{\text{analito}} - \text{tr}_{\text{solvente}}}{\text{tr}_{\text{IS}} - \text{tr}_{\text{solvente}}} \quad (2-3)$$

Este parámetro permitió definir un factor de respuesta relativo para cada compuesto del cual no se poseía un estándar original, pero cuyo trr era único (Ec. 2-4).

$$\frac{\text{Conc}_{\text{analito}}}{\text{Conc}_{\text{IS}}} = \frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{IS}}} (A \text{ trr}^2 + B \text{ trr} + C) \quad (2-4)$$

Las soluciones a inyectar fueron preparadas estimando previamente rangos de concentraciones esperadas de cada tipo de TAG en las muestras a analizar. Cabe destacar que en el cálculo de la concentración de los diferentes estándares se tuvo en cuenta el grado de pureza de los mismos, considerando exclusivamente la masa de TAG incorporada a la solución a inyectar. La pureza de los mismos (expresada en %



m/m) se ubicó en el rango de: 96.8 - 98.7. Las soluciones a inyectar fueron preparadas a partir de las soluciones madre detalladas a continuación.

### Soluciones madre de TAG

*Sci*ón. de PoPoPo (5.00 mg PoPoPo/mL): 5.02 mg de PoPoPo + 1 mL de piridina.

*Sci*ón. de TAG<sub>i</sub> (10 mg/mL): soluciones en piridina de cada estándar *i*, preparadas teniendo en cuenta la pureza de cada uno de ellos.

Soluciones a inyectar para curvas de calibración de TAG (entre paréntesis se especifica la relación concentración de estándar/concentración de IS)

*Solución 1:* 20.20 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(0.16) 1.61 µL de *sci*ón. de PPO.  
195 µL de piridina.  
5 µL de MSTFA.

*Solución 2:* 16.83 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(0.24) 2.02 µL de *sci*ón. de POL/OOO/POO/PPO.  
155 µL de piridina.  
5 µL de MSTFA.

*Solución 3:* 12.51 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(0.32) 2.00 µL de *sci*ón. de StOO/PStSt/PLL/StStO/StStSt/LLL/PPO.  
106 µL de piridina.  
5 µL de MSTFA.

*Solución 4:* 6.71 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(0.70) 2.35 µL de *sci*ón. de OOO/POL/POO.  
55 µL de piridina.  
5 µL de MSTFA.

*Solución 5:* 5.42 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(1.12) 3.04 µL de *sci*ón. de OOO/POL/POO/StOO/PStSt.  
34 µL de piridina.  
5 µL de MSTFA.

*Solución 6:* 4.01 µL de *sci*ón. de PoPoPo.

(1.70) 3.41 µL de *sci*ón. de OOO/POL/POO/StOO/PStSt.  
18 µL de piridina.

5  $\mu$ L de MSTFA.

*Solución 7:* 3.06  $\mu$ L de solución de PoPoPo.  
 (3.50) 5.35  $\mu$ L de solución de PLL/StStSt/PStSt.  
 9.5  $\mu$ L de piridina.  
 5  $\mu$ L de MSTFA.

*Solución 8:* 3.06  $\mu$ L de solución de PoPoPo.  
 (3.50) 5.35  $\mu$ L de solución de LLL/StStO/StOO.  
 9.5  $\mu$ L de piridina.  
 5  $\mu$ L de MSTFA.

*Solución 9:* 3.51  $\mu$ L de solución de PoPoPo.  
 (5.72) 10.05  $\mu$ L de solución de PLL/StStO.  
 10  $\mu$ L de piridina.  
 5  $\mu$ L de MSTFA.

*Solución 10:* 3.51  $\mu$ L de solución de PoPoPo.  
 (5.72) 10.05  $\mu$ L de solución de LLL/StStSt.  
 10  $\mu$ L de piridina.  
 5  $\mu$ L de MSTFA.

*Solución 11:* 4.03  $\mu$ L de solución de PoPoPo.  
 (7.51) 15.15  $\mu$ L de solución de PLL/StStSt.  
 5  $\mu$ L de piridina.  
 5  $\mu$ L de MSTFA.

Cada una de las 11 soluciones fueron preparadas por duplicado e inyectadas por triplicado (volumen de inyección: 1  $\mu$ L). Mediante regresión no lineal se ajustaron los datos obtenidos, convergiendo a los parámetros A, B y C presentados en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Parámetros correspondientes a la Ec. (2-4).

Parámetro	Valor <sup>A</sup>	R <sup>2</sup>
A	1.89 $\pm$ 0.013	
B	-2.44 $\pm$ 0.018	0.9814
C	2.02 $\pm$ 0.024	

<sup>A</sup>Valor promedio  $\pm$  desvío estándar. N = 103.

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE MUESTRA A ANALIZAR

En este caso se requirió la preparación de una *solución madre de muestra*, para la cual se pesaron como mínimo 3 mg de la misma y luego se agregó un volumen de piridina de manera de lograr una solución de concentración 38.2 mg/mL. Luego, a partir de la misma y de las soluciones madre de CCC, TD y PoPoPo, se preparó la solución de muestra a inyectar de la siguiente manera:

*Solución de muestra a inyectar:* 15  $\mu\text{L}$  de solución madre de muestra.  
4.55  $\mu\text{L}$  de solución de TD.  
4.55  $\mu\text{L}$  de solución de CCC.  
5.21  $\mu\text{L}$  de solución de PoPoPo.  
28  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

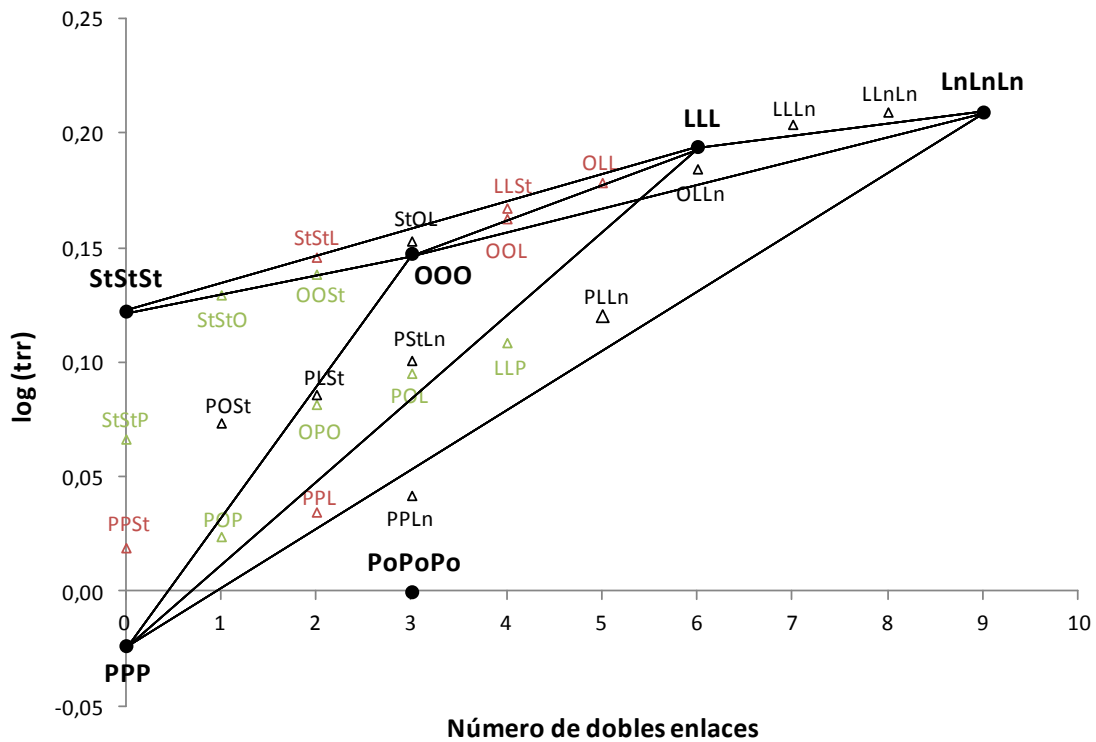
El volumen de inyección seleccionado fue de 1  $\mu\text{L}$ . Cabe destacar que, previamente a ser utilizadas, cada una de las soluciones detalladas en la presente sección fueron agitadas mediante ultrasonido. El objetivo de esta operación consistió en asegurar, por un lado, una correcta homogeneización de las mismas y, por otro, la completa disolución de los compuestos en solución, especialmente en el caso de aquellos cuyos puntos de fusión resultaban ser elevados.

### IDENTIFICACIÓN DE PICOS

La identificación de los picos no resultó una tarea sencilla ya que se distinguieron una totalidad de 53, considerando FFA, MAG, DAG y TAG. Ciertos picos, cuya identificación no fue posible llevar a cabo mediante los estándares originales con los que se contaba, fueron dilucidados mediante la generación de mezclas controladas de glicéridos y FFA a partir de reacciones de interesterificación entre estándares puros (tripalmitina (PPP), triestearina (StStSt), trioleína (OOO) y trilinoleína (LLL)).

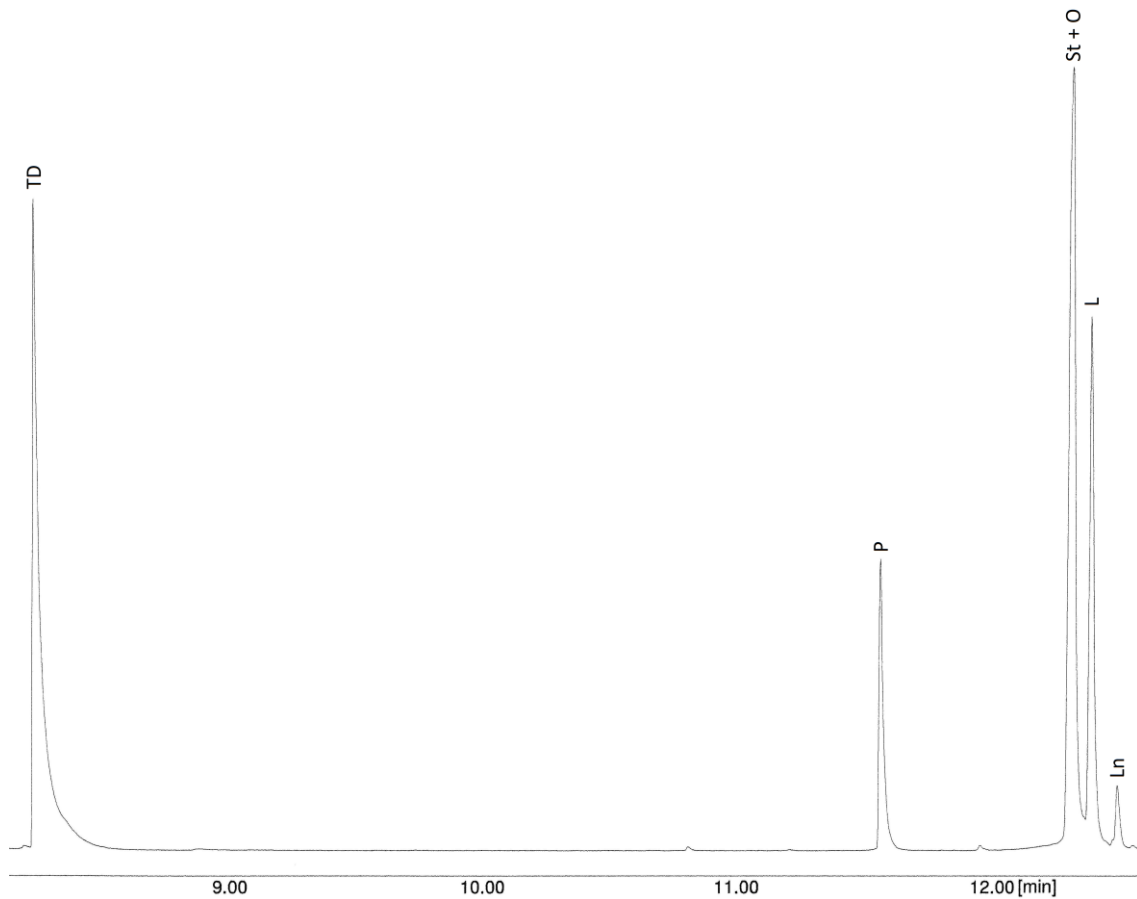
En el caso de la identificación de los TAG, componentes mayoritarios de los sustratos y productos de interesterificación, se utilizaron además otros recursos para asegurar una correcta identificación de todos los picos. En primer lugar se graficó el logaritmo del trr versus el número de dobles enlaces de los TAG ya identificados (Figura 2.3.) y luego se ubicaron los puntos correspondientes a los compuestos

incógnita, logrando finalmente la identificación de todos ellos (adaptación del Método Oficial AOCS Ce 5b-89, 2006).



**Figura 2.3.** Gráfico construido para la identificación de los TAG presentes en las muestras. (● TAG monoácido del cual se poseía el estándar, Δ TAG mixto del cual se poseía el estándar, Δ TAG mixto generado a partir de TAG monoácidos, Δ TAG incógnita dilucidado a partir del presente gráfico). P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico.

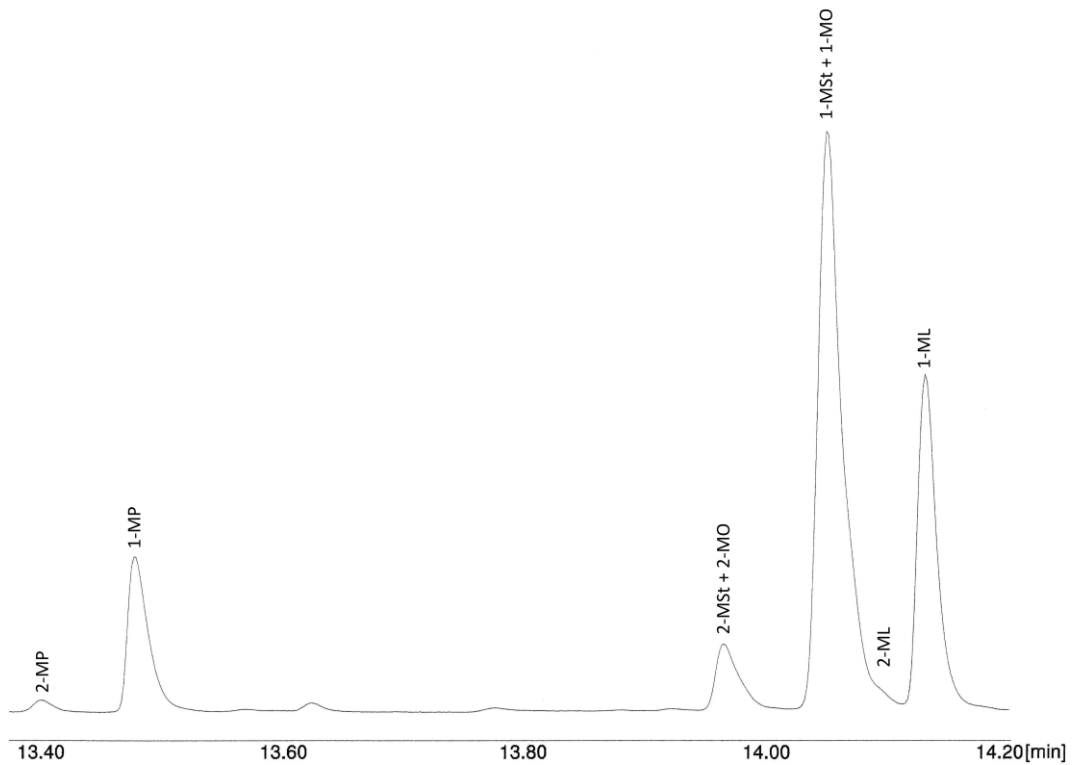
En las Figuras 2.4. a 2.9. se presentan cromatogramas de cada una de las zonas en las cuales eluyen los compuestos, identificando la totalidad de los picos obtenidos en los productos de reacción.



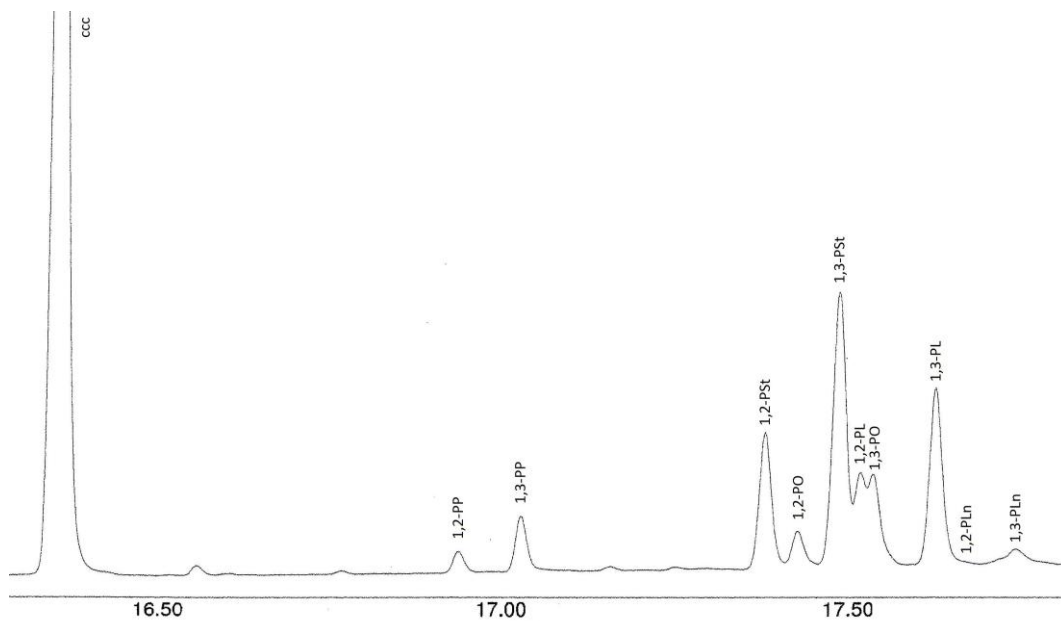
**Figura 2.4.** Cromatograma de la zona de ácidos grasos con su respectivo estándar interno. P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico. TD: tetradecano (estándar interno). Ver Tabla 2.2. para detalles de las condiciones cromatográficas.

Como puede observarse en la Figura 2.4., los ácidos esteárico y oleico eluyen a la misma velocidad, superponiéndose sus respectivos picos cromatográficos.

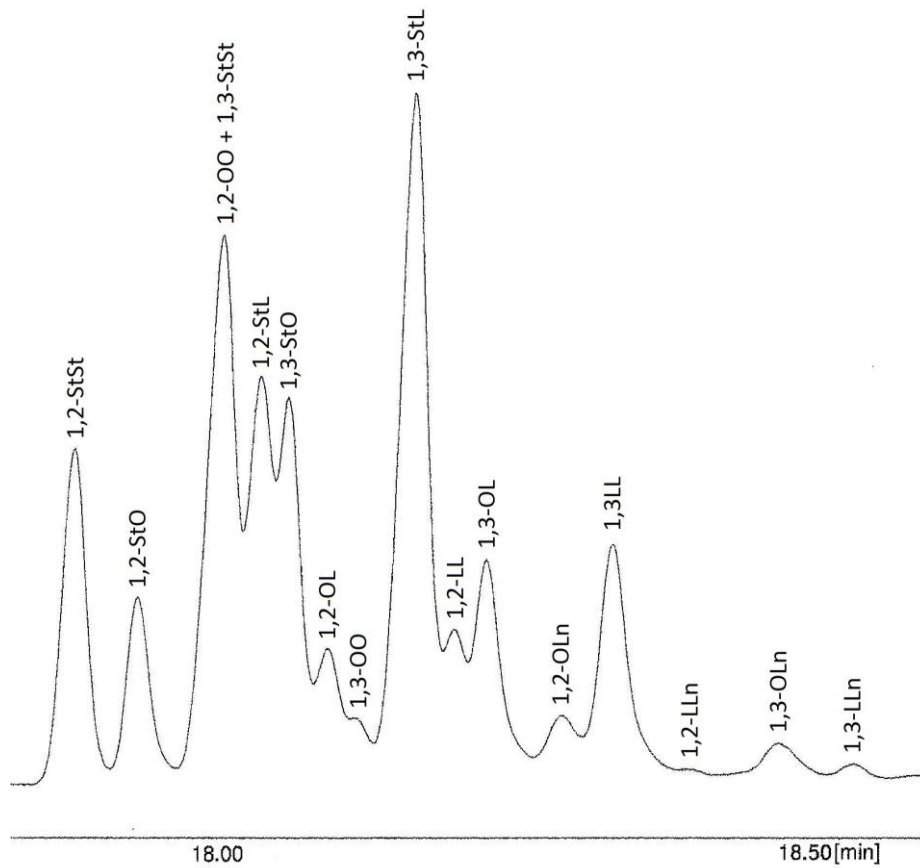
En el caso de los MAG (Figura 2.5.), se solapan los picos correspondientes a la 2-monoestearina y 2-monooleína, mientras que la 1-monoestearina es detectada en simultáneo con la 1-monooleína, siendo imposible la integración independiente de sus correspondientes picos cromatográficos.



**Figura 2.5.** Cromatograma de la zona de monoglicéridos (MAG). MP: monopalmitina, MSt: monoestearina, MO: monooleína, ML: monolinoleína. No se distingue entre los isómeros 1-MAG y 3-MAG. Ver Tabla 2.2. para detalles de las condiciones cromatográficas.

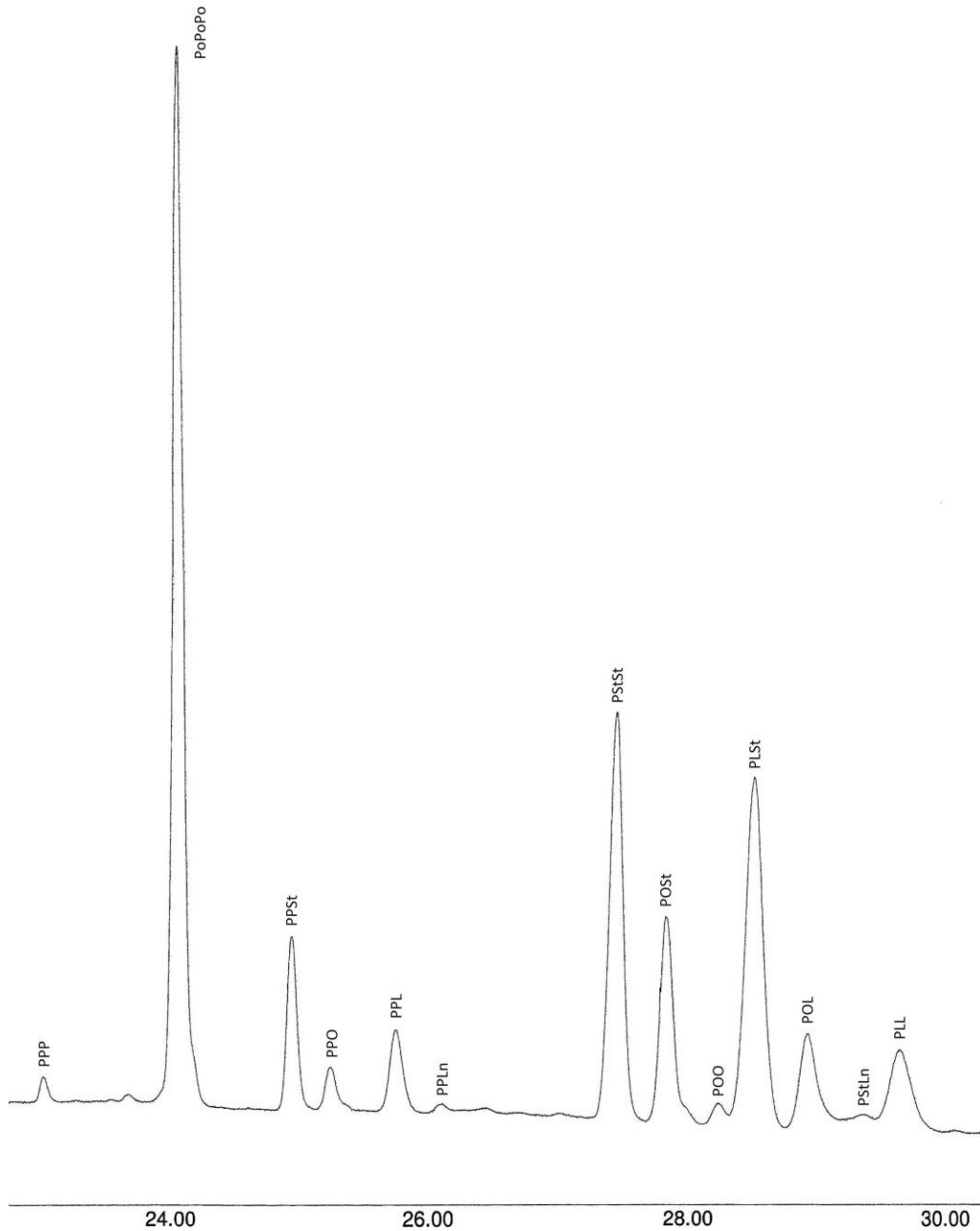


**Figura 2.6.** Cromatograma parcial de la zona de diglicéridos (DAG) con su respectivo estándar interno. P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico. CCC: tricaprina (estándar interno). No se distingue entre los isómeros 1,2- y 2,3-DAG. Ver Tabla 2.2. para detalles de las condiciones cromatográficas.



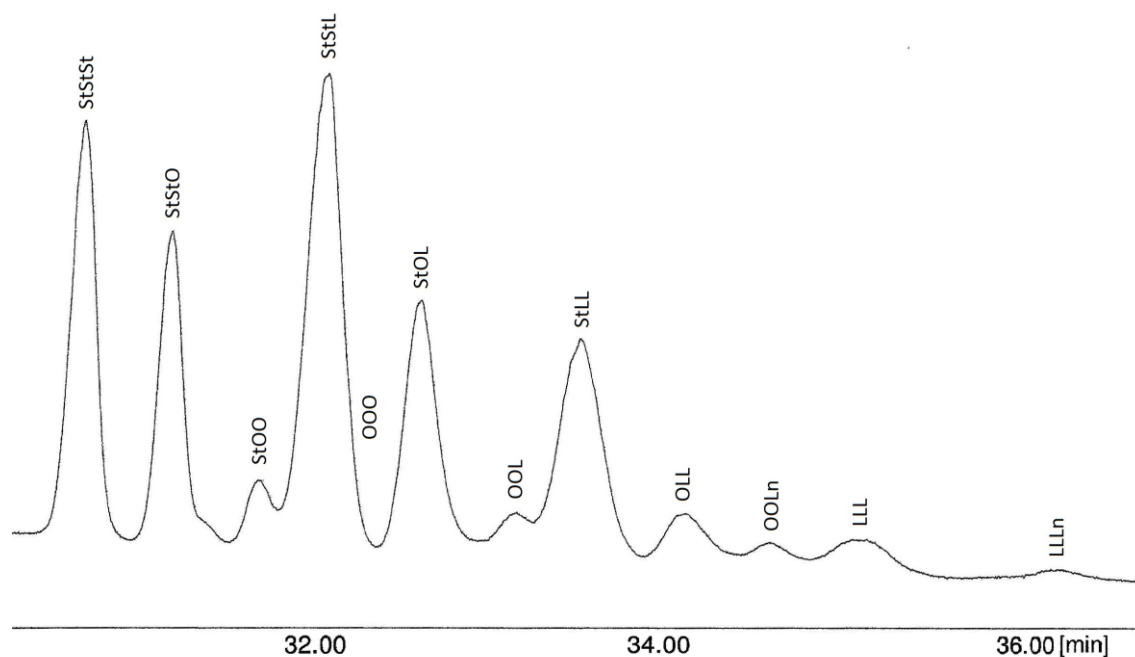
**Figura 2.7.** Cromatograma parcial de la zona de diglicéridos (DAG).  
St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico.  
No se distingue entre los isómeros 1,2- y 2,3-DAG.  
Ver Tabla 2.2. para detalles de las condiciones cromatográficas.

Como puede observarse en la Figura 2.7. no es posible integrar de manera independiente los picos correspondientes a los compuestos 1,2-dioleína y 1,3-diestearina.



**Figura 2.8.** Cromatograma parcial de la zona de triglicéridos (TAG) con su respectivo estándar interno. P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico. PoPoPo: tripalmitoleína (estándar interno). No se distingue entre isómeros de posición. Ver Tabla 2.2. para detalles de las condiciones cromatográficas.

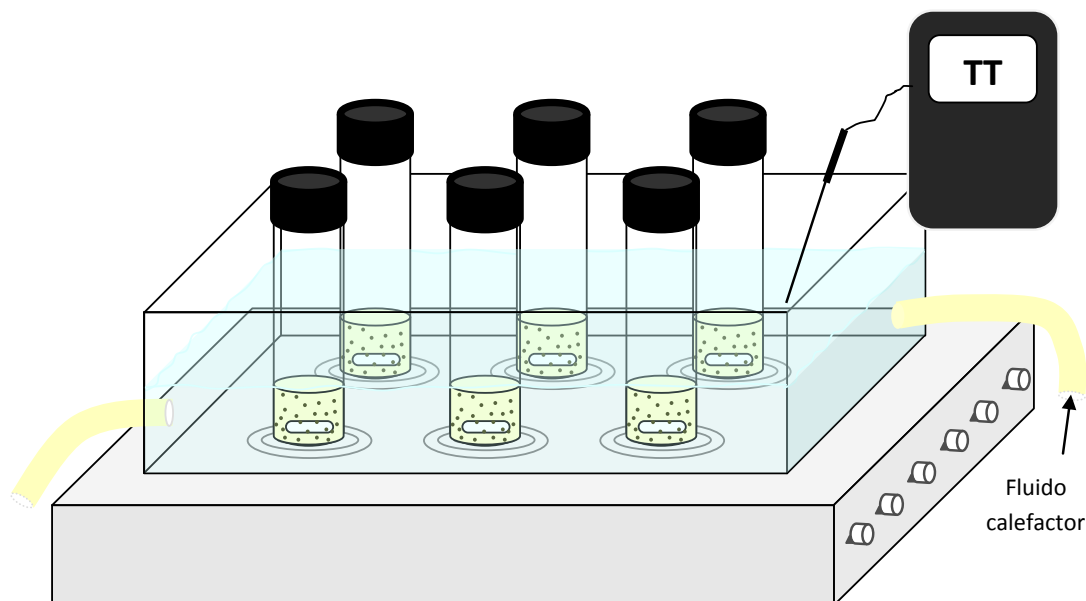




**Figura 2.9.** Cromatograma parcial de la zona de triglicéridos (TAG).  
 St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, Ln: ácido linolénico.  
 No se distingue entre isómeros de posición. Ver Tabla 2.2. para  
 detalles de las condiciones cromatográficas.

#### 2.2.10. PROTOCOLO DE REACCIÓN

Las reacciones se llevaron a cabo en sistemas cerrados provistos de agitación magnética y mantenidos a temperatura constante por medio de un fluido calefactor (Figura 2.10.). La mezcla de grasa y aceite (1 g total) fue precalentada y homogeneizada previo al agregado de la enzima inmovilizada, momento en el que se comenzó a desarrollar la reacción. En los casos en que se utilizaron tamices moleculares éstos se agregaron en ese mismo momento, previo secado en una estufa a 100°C durante 24 h. Por otro lado, en los sistemas con solvente, se adicionaron 3 mL de hexano cromatográfico (previamente secado con tamices moleculares, 20 g en 300 mL (Maruyama et al., 2000)) a la mezcla de reacción. Igualmente, se decidió utilizar un solvente de grado cromatográfico con la intención de minimizar el contenido de agua inicial. La interrupción de la reacción fue realizada mediante el filtrado de la mezcla con papel de filtro Whatman grado 1.



**Figura 2.10.** Esquema del sistema de reacción.

Los productos de reacción fueron inmediatamente almacenados a temperaturas inferiores a 0°C. En el caso de los sistemas con solvente se procedió a evaporar el mismo bajo corriente de nitrógeno hasta peso constante previo a su almacenamiento.

Cabe aclarar que la totalidad de las muestras se obtuvieron de ensayos independientes con el objetivo de evitar la propagación de posibles errores experimentales.

### 2.2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de la significancia de las diferencias encontradas para cada uno de los ácidos grasos determinados por ambas técnicas de metilación (apartado 2.2.8.1.1.) se aplicó el test  $t$  con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

El análisis estadístico desarrollado para el diseño de experimentos planteado en el Capítulo 3 se detalla en el desarrollo del mismo.

La totalidad de las determinaciones llevadas a cabo en la presente tesis se realizaron como mínimo por duplicado. En los casos en que los coeficientes de variación superaron el 10%, se realizaron mayor número de repeticiones con el objetivo de eliminar errores experimentales.

## 2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

### 2.3.1. ACEITES REFINADOS

La composición ácida del primer lote de aceite de soja refinado se muestra en la Tabla 2.4., mientras que la distribución posicional de los mismos se detalla en la Tabla 2.5.

El contenido de ácidos grasos libres (FFA) determinado fue de 1,13% (m/m), el correspondiente a monoglicéridos (MAG) de 0,14% (m/m) y el de diglicéridos (DAG) de 0,84% (m/m).

**Tabla 2.4.** Composición ácida del aceite de soja refinado utilizado para el diseño experimental.

Ácido graso	Concentración (% m/m)
C14:0	0.09 ± 0.00
C15:0	0.02 ± 0.00
C16:0	11.43 ± 0.28
C16:1	0.09 ± 0.00
C17:0	0.10 ± 0.00
C17:1	0.05 ± 0.00
C18:0	4.74 ± 0.21
C18:1, 9t	0.05 ± 0.00
C18:1, 9c	19.88 ± 0.05
C18:1, 10c	1.62 ± 0.04
C18:1, 13c	0.05 ± 0.01
C18:2, 9t-12t	0.02 ± 0.00
C18:2, 9c-12t	0.38 ± 0.00
C18:2, 9t-12c	0.34 ± 0.00
C18:2, 9c-12c	52.60 ± 0.46
C20:0	0.33 ± 0.01
C18:3, 6c-9c-12c	0.60 ± 0.01
C20:1	0.53 ± 0.01
C18:3, 9c-12c-15c	6.13 ± 0.07
C21:0	0.03 ± 0.00
C20:2	0.04 ± 0.00
C22:0	0.32 ± 0.00
N.I.	0.50 ± 0.05

N.I.: compuestos no identificados.

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

**Tabla 2.5.** Distribución posicional de los grupos acilo correspondiente al aceite de soja refinado.

Distribución de ácidos grasos (% mol/mol)		
Posición <i>sn</i> -2	C16:0	2.18 ± 0.12
	C18:0	1.29 ± 0.21
	C18:1	20.28 ± 0.83
	C18:2	62.52 ± 1.57
	C18:3	5.51 ± 0.10
	N.I.	8.21 ± 0.97
	S	3.78 ± 0.22
Posición <i>sn</i> -1,3	U	96.22 ± 0.81
	S	26.43 ± 0.22
	U	73.57 ± 0.81

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

N.I.: compuestos no identificados.

En la Tabla 2.6. se presenta su composición detallada, mientras que en la Tabla 2.7. se muestra la misma información agrupada según compuestos mayoritarios y, en el caso de los triglicéridos, discriminada por el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de las diferentes especies. Cabe aclarar que para llevar a cabo este agrupamiento no se tuvo en cuenta la isomería de posición; es decir que, por ejemplo, con la denominación SUS se hace referencia a los triglicéridos SSU, USS y SUS indistintamente. Las concentraciones se encuentran expresadas en base molar, medida que se utilizó para evaluar el progreso de los productos de reacción en el tiempo para el estudio cinético.

**Tabla 2.6.** Composición del aceite de soja refinado.

Compuesto		Concentración (% m/m)
FFA	P	0.35 ± 0.08
	St + O	0.31 ± 0.01
	L	0.31 ± 0.03
	Ln	0.04 ± 0.01
MAG <sup>A</sup>	2-MP	0.01 ± 0.00
	1-MP	0.06 ± 0.01
	1-MSt + 1-MO + 2-ML	0.04 ± 0.00
DAG <sup>B</sup>	1,2-PP	0.01 ± 0.00
	1,3-PP	0.03 ± 0.01
	1,2-PSt	0.02 ± 0.00
	1,2-PO	0.02 ± 0.00
	1,2-PL	0.08 ± 0.02
	1,3-PO	0.01 ± 0.00
	1,3-PL	0.11 ± 0.01
	1,2-PLn	0.07 ± 0.02
	1,3-PLn	0.01 ± 0.00
	1,3-StSt + 1,2-OO	0.03 ± 0.01
	1,2-StL	0.04 ± 0.02
	1,3-StO	0.01 ± 0.00
	1,2-OL	0.07 ± 0.01
	1,3-OO	0.05 ± 0.01
	1,3-StL	0.04 ± 0.01
	1,2-LL	0.09 ± 0.02
	1,3-OL	0.16 ± 0.04
	1,3-LL	0.24 ± 0.02
	1,2-LLn	0.02 ± 0.01
	1,3-OLn	0.02 ± 0.01
TAG <sup>C</sup>	PPO	0.66 ± 0.03
	PPL	2.85 ± 0.07
	PPLn	0.13 ± 0.07
	PStSt	0.07 ± 0.04
	POSt	0.75 ± 0.04
	POO	2.58 ± 0.10
	PLSt	2.18 ± 0.03
	POL	8.56 ± 0.13
	PLL	14.47 ± 0.71
	PLLn	0.53 ± 0.07
	StStSt	1.79 ± 0.27
	StStO	0.28 ± 0.09
	StOO	0.94 ± 0.16
	StStL	2.29 ± 0.15
	StOL	3.90 ± 0.20
	OOL	8.28 ± 0.63
	StLL	4.65 ± 0.49
OLL	18.26 ± 0.27	
LLL	20.39 ± 0.57	
LLLn	3.96 ± 0.72	

P: ác. palmítico, St: ác. esteárico, O: ác. oleico, L: ác. linoleico, Ln: ác. linolénico.

<sup>A</sup>M: prefijo que denota MAG y que antecede al FA esterificado al mismo. No se distingue entre los isómeros 1-MAG y 3-MAG.

<sup>B</sup>No se distingue entre los isómeros 1,2- y 2,3-DAG.

<sup>C</sup>No se distinguen isómeros de posición.

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

**Tabla 2.7.** Composición (mM) del aceite de soja refinado en ácidos grasos libres (FFA), monoglicéridos (MAG), diglicéridos (DAG) y triglicéridos (TAG).

FFA	MAG	DAG
<b>33.10 ± 3.94</b>	<b>3.09 ± 0.29</b>	<b>16.52 ± 2.47</b>

TAG	SSS	SUS	UUS	UUU
<b>992.06 ± 3.24</b>	18.56 ± 2.28	75.90 ± 3.71	365.27 ± 2.34	532.32 ± 6.02

U: ácido graso insaturado, S: ácido graso saturado.

SSS: TAG trisaturado, SUS: TAG disaturado/monoinsaturado, UUS: TAG monosaturado/diinsaturado,

UUU: TAG triinsaturado.

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

El índice de iodo (IV) resultó ser de 129.07, la densidad del aceite de 0.8891 g/cm<sup>3</sup> (70°C) y el contenido de humedad de 0.05% (m/m).

La composición acídica del segundo lote de aceite de soja refinado fue similar a la del aceite previamente utilizado, aunque los valores del contenido de los productos de hidrólisis se ubicaron en los siguientes valores (% m/m): 1.00 para los ácidos grasos libres, 0.61 para monoglicéridos y 2.30 para diglicéridos.

Por otro lado, también se determinó el índice de peróxidos (PV) y el valor de p-anisidina (p-AV) del aceite ya que los compuestos originados durante la oxidación de los aceites (peróxidos y aldehídos) resultan venenosos para el catalizador enzimático, siendo necesario comprobar que los valores de dichos parámetros se encuentren por debajo de ciertos límites máximos (PV = 1 mEq. O<sub>2</sub>/kg, p-AV = 2) para evitar la inactivación de la enzima (Costales y Fernández, 2009). El índice de peróxidos resultó ser de 1.17 mEq. O<sub>2</sub>/kg, mientras que el p-AV no presentó valores detectables por la técnica utilizada. Considerando que en ninguna de las reacciones llevadas a cabo en el desarrollo de la presente tesis el contenido de aceite superó el 80% (m/m); y que, por otra parte, el PV del aceite hidrogenado resultó ser sustancialmente menor, se concluyó que la totalidad de las mezclas de reacción cumplieron con las especificaciones de calidad en este sentido.

### 2.3.2. ACEITES HIDROGENADOS

Al analizar la composición acídica del aceite de soja parcialmente hidrogenado (Tabla 2.8.) se observó que el contenido de ácidos grasos *trans* era considerablemente elevado (21.8% m/m), poniendo en evidencia la incompleta hidrogenación del mismo. Debido a la imposibilidad de obtener un aceite de soja totalmente hidrogenado se decidió comenzar a utilizar éste al principio de las experiencias. El mismo estaba compuesto por un 0.88% (m/m) de FFA, 0.15% (m/m) de MAG y 0.62% (m/m) de DAG. Por otro lado poseía un índice de iodo (IV) de 27.27 y un punto de fusión (mp) de 64.1°C.

El contenido de Ni residual de este aceite hidrogenado (remanente del proceso de hidrogenación) se evaluó en forma cualitativa por comparación con un aceite de soja refinado y se concluyó que, mediante el uso de un papel de filtro Whatman grado 3, la reducción en la concentración del mencionado metal resultó aceptable al ser ésta comparable a la del aceite refinado (Figura 2.5.).



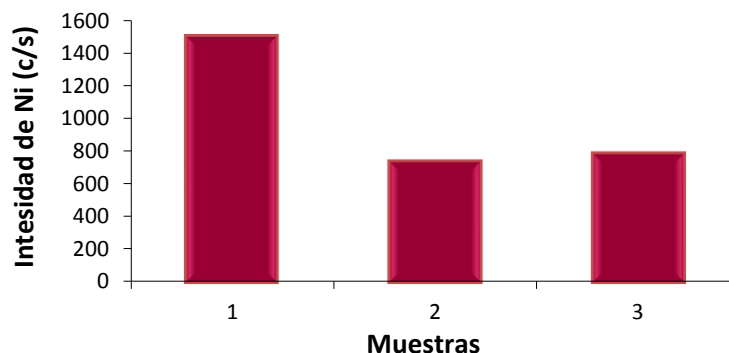
**Tabla 2.8.** Composición ácida del aceite de soja hidrogenado utilizado para el diseño experimental (Capítulo 3).

Ácido graso	Concentración (% m/m)
C14:0	0.10 ± 0.00
C15:0	0.04 ± 0.00
C16:0	11.27 ± 0.60
C17:0	0.17 ± 0.01
C18:0	55.38 ± 2.26
C18:1, 4t	0.25 ± 0.01
C18:1, 5t	0.48 ± 0.01
C18:1, (6t-8t)	5.95 ± 0.32
C18:1, 9t	2.75 ± 0.07
C18:1, 10t	3.96 ± 0.37
C18:1, 11t	2.25 ± 0.16
C18:1, 12t	2.57 ± 0.08
C18:1, (13t+14t) + C18:1, (6c+8c)	4.66 ± 0.15
C18:1, 9c	3.02 ± 0.78
C18:1, (10c+15t)	0.97 ± 0.11
C18:1, 11c	1.08 ± 0.03
C18:1, 12c	1.08 ± 0.04
C18:1, 13c	0.61 ± 0.02
C18:1, 16t	0.33 ± 0.01
C18:1, 14c	0.45 ± 0.02
C18:1, 15c	0.32 ± 0.01
C18:2, t,t	0.05 ± 0.01
C18:2, 9t,12t	N.D.
C18:2, c,t	0.02 ± 0.00
C18:2, 9c,12t	0.17 ± 0.00
C18:2, 9t,12c	0.02 ± 0.00
C18:2, t,c	N.D.
C18:2, 9c,12c	0.16 ± 0.01
C20:0	0.48 ± 0.02
C18:3, 9c,12c,15c	0.04 ± 0.04
C21:0	0.03 ± 0.00
C22:0	0.33 ± 0.02
N.I.	0.29 ± 0.01

N.I.: compuestos no identificados.

N.D.: compuestos no detectables (< 0.01%).

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.



**Figura 2.5.** Intensidades presentadas por Ni determinadas por Espectrometría por fluorescencia de rayos X.  
1 y 2: Grasa purificada con papel de filtro Whatman grado 1 y 3, respectivamente; 3: Aceite de soja refinado.

La composición ácida del *aceite de soja totalmente hidrogenado* (FHSO) se presenta en la Tabla 2.9. En este caso, puede observarse que el contenido de isómeros *trans* fue relativamente bajo (0,29% (m/m)). En consecuencia, en los capítulos en los cuales se utilizó este FHSO como sustrato de la reacción (Capítulos 4 y 5), se designará como ácido oleico (O) a los isómeros C18:1, sin distinguir entre los isómeros *cis* y *trans*.

En cuanto a la distribución de los ácidos grasos en las diferentes posiciones de los glicéridos, ésta se detalla en la Tabla 2.10.

Por otro lado, las concentraciones de productos de hidrólisis de TAG presentes en esta grasa se ubicaron en los siguientes valores (% m/m): 1.20 para FFA, 0.18 para MAG y 1.32 en el caso de los DAG. La distribución de los componentes mayoritarios se detalla en las Tablas 2.11. (% m/m) y 2.12. (concentraciones molares).

**Tabla 2.9.** Composición ácida del aceite de soja totalmente hidrogenado.

Ácido graso	Concentración (% m/m)
C14:0	0.22 ± 0.00
C15:0	0.09 ± 0.00
C16:0	12.28 ± 0.11
C16:1	0.08 ± 0.00
C17:0	0.29 ± 0.00
C18:0	83.80 ± 0.10
C18:1, 5t	0.07 ± 0.00
C18:1, 6t-8t	0.22 ± 0.01 <sup>α</sup>
C18:1, 9t	
C18:1, 10t	
C18:1, 11t	
C18:1, 9c	
C18:1, 11c	1.25 ± 0.00
C18:1, 12c	0.04 ± 0.00
C18:1, 14c	0.02 ± 0.00
C18:1, 15c	0.01 ± 0.00
C18:2, 9c-12c	0.07 ± 0.00
C20:0	0.30 ± 0.00
C18:3, 9c-12c-15c	0.63 ± 0.01
C21:0	0.04 ± 0.00
C22:0	0.04 ± 0.00
C24:0	0.40 ± 0.01
N.I.	0.14 ± 0.00
N.I.	0.01 ± 0.01

N.I.: compuestos no identificados.

N.D.: compuestos no detectables (< 0.01%).

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

<sup>α</sup>Se cuantificó el grupo de compuestos debido a que, por su baja concentración, no fue posible integrar los picos individualmente.

**Tabla 2.10.** Distribución posicional de los grupos acilo correspondiente al aceite de soja totalmente hidrogenado.

Distribución de ácidos grasos (% mol/mol) <sup>A</sup>		
Posición <i>sn</i> -2	C16:0	11.49 ± 2.05
	C18:0	85.29 ± 2.81
	C18:1	0.83 ± 0.26
	C18:2	1.96 ± 0.21
	C18:3	0.43 ± 0.04
	S	96.78 ± 1.05
	U	3.22 ± 0.31
Posición <i>sn</i> -1,3	S	98.60 ± 1.05
	U	1.40 ± 0.31

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

N.I.: compuestos no identificados.

<sup>A</sup>Calculada teóricamente tal como se detalla en el apartado 2.2.8.

**Tabla 2.11.** Composición del aceite de soja totalmente hidrogenado.

Compuesto		Concentración (% m/m)
FFA	P	0.41 ± 0.03
	St + O	0.77 ± 0.14
MAG <sup>A</sup>	2-MP	0.01 ± 0.00
	1-MP	0.01 ± 0.02
	2-MSt + 2-MO	0.01 ± 0.00
	1-MSt + 1-MO	0.08 ± 0.01
DAG <sup>B</sup>	1,2-PP	0.02 ± 0.01
	1,3-PP	0.05 ± 0.00
	1,2-PSt	0.06 ± 0.01
	1,2-PO	0.01 ± 0.00
	1,3-PO	0.04 ± 0.01
	1,3-PL	0.01 ± 0.00
	1,2-PLn	0.03 ± 0.02
	1,3-PLn	0.02 ± 0.01
	1,2-StSt	0.18 ± 0.01
	1,3-StSt + 1,2-OO	0.81 ± 0.08
	1,3-StO	0.04 ± 0.00
	1,3-OO	0.02 ± 0.01
TAG <sup>C</sup>	1,3-StL	0.01 ± 0.00
	PPP	0.25 ± 0.02
	PPSt	4.08 ± 0.23
	PPO	0.22 ± 0.01
	PPL	0.13 ± 0.04
	PPLn	0.28 ± 0.01
	PStSt	29.20 ± 0.91
	POSt	0.51 ± 0.29
	POO	0.32 ± 0.01
	POL	0.50 ± 0.03
	StStSt	59.91 ± 1.23
StStO	0.29 ± 0.09	
StOO	0.17 ± 0.04	

P: ác. palmítico, St: ác. esteárico, O: ác. oleico, L: ác. linoleico, Ln: ác. linolénico.

<sup>A</sup>M: prefijo que denota MAG y que antecede al FA esterificado al mismo. No se distingue entre los isómeros 1-MAG y 3-MAG.

<sup>B</sup>No se distingue entre los isómeros 1,2- y 2,3-DAG.

<sup>C</sup>No se distinguen isómeros de posición.

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

**Tabla 2.12.** Composición (mM) del aceite de soja totalmente hidrogenado en ácidos grasos libres (FFA), monoglicéridos (MAG), diglicéridos (DAG) y triglicéridos (TAG).

FFA	MAG	DAG
<b>39.70 ± 5.27</b>	<b>4.47 ± 0.50</b>	<b>21.30 ± 1.47</b>

TAG	SSS	SUS	UUS	UUU
<b>961.62 ± 2.63</b>	925.07 ± 5.48	14.64 ± 3.97	9.99 ± 0.48	11.93 ± 0.57

U: ácido graso insaturado, S: ácido graso saturado.

SSS: TAG trisaturado, SUS: TAG disaturado/monoinsaturado, UUS: TAG monosaturado/diinsaturado, UUU: TAG triinsaturado.

Valor promedio de 3 mediciones independientes ± desvío estándar.

Finalmente, el FHSO presentó las siguientes características: punto de fusión de 70°C, índice de iodo (IV) de 2.14, contenido de humedad de 0.15% (m/m), PV de 0.20 mEq. O<sub>2</sub>/kg y densidad a 70°C de 0.8693 g/cm<sup>3</sup>.

## 2.4. NOMENCLATURA

SO: aceite de soja refinado.

HSO: aceite de soja hidrogenado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

MSTFA: N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida.

PV: índice de peróxidos.

p-AV: valor de anisidina.

IV: índice de iodo.

DSC: calorimetría de barrido diferencial.

FAME: éster metílico de ácido graso.

ID: diámetro interno.

TLC: cromatografía de capa fina.

FID: detector de ionización de llama.

FA: ácidos grasos.

FFA: ácidos grasos libres.

MAG: monoglicéridos.

DAG: diglicéridos.

TAG: triglicéridos.

RF: factor de respuesta.

IS: estándar interno.

RRF: factor de respuesta relativo.

TD: tetradecano.

CCC: tricaprina.

MP: monopalmitina.  
PP: dipalmitina.  
PoPoPo: tripalmitoleína.  
PPP: tripalmitina.  
StStSt: triestearina.  
OOO: trioleína.  
LLL: trilinoleína.  
trr: tiempo de retención relativo.  
P: ácido palmítico.  
St: ácido esteárico.  
O: ácido oleico.  
L: ácido linoleico.  
Ln: ácido linolénico.  
U: ácido graso insaturado.  
S: ácido graso saturado.  
SSS: TAG trisaturado.  
SUS: TAG disaturado/monoinsaturado.  
UUS: TAG monosaturado/diinsaturado.  
UUU: TAG triinsaturado.  
N.I.: compuestos no identificados.  
N.D.: compuestos no detectables.

## 2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, L.; M. Fraga y M. Juárez (2000). *Determination of trans fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 77(2):131-136.
- AOCS (2006). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, EEUU, AOCS Press.
- Buchgraber, M.; F. Ulberth y E. Anklam (2000). *Comparison of HPLC and GLC techniques for the determination of the triglyceride profile of cocoa butter*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(8):3359-3363.
- Buchgraber, M. y E. Anklam (2003). *Institute for reference materials and measurements*. [http://irmm.jrc.ec.europa.eu/activities/cocoa\\_butter\\_calculation\\_toolbox/Documents/eur20831en\\_sop\\_dc\\_quantification.pdf](http://irmm.jrc.ec.europa.eu/activities/cocoa_butter_calculation_toolbox/Documents/eur20831en_sop_dc_quantification.pdf). Último acceso: 12/12/2011.
- Buchgraber, M.; F. Ulberth y E. Anklam (2004). *Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography A. 1036(2):197-203.
- Carelli, A. A. y A. Cert (1993). *Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques*. Journal of Chromatography A. 630(1-2):213-222.

- Cedeño González, F. O.; M. M. Prieto González; J. C. Bada Gancedo y R. Alonso Suárez (1999). *Estudio de la densidad y de la viscosidad de algunos ácidos grasos puros*. Grasas y Aceites. 50:359 - 368.
- Collison, M. W. (2006). *Frequently asked questions about trans fatty acid analysis*. INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials. 17:16-18.
- Costales, R. y A. Fernández (2009). *Hidrogenación e interesterificación*. Temas Selectos en Aceites y Grasas. J. M. Block y D. Barrera-Arellano. San Pablo, Brasil, Editorial Blücher. Vol. 1.
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids*. Ayr, Escocia, The Oily Press.
- Fernández, M. B. (2006). *Control de trans-isómeros en la hidrogenación de aceite de girasol*. Tesis doctoral, U.N.S., Bahía Blanca, Argentina.
- Graciani-Constante, E. (2006). *Los aceites y grasas: composición y propiedades*. Madrid, España, AMV Ed. y Mundi Prensa.
- Gutiérrez-Ayesta, C.; A. A. Carelli y M. L. Ferreira (2007). *Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids*. Enzyme and Microbial Technology. 41(1-2):35-43.
- IUPAC (1992) *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. International Union of Pure and Applied Chemistry. Oxford, Reino Unido.
- Ken'ichi, I. y F. Yumeto (2010). *Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography*. The Journal of Lipid Research. 51:635 - 640.
- Lee, K.-T. y C. Akoh (1998). *Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(4):495-499.
- León-Camacho, M.; M. V. Ruiz-Méndez y E. Graciani-Constante (1999). *Isomerization of fatty acids during deodorization and physical refining — stripping with nitrogen*. Lipid / Fett. 101(8):290-294.
- Li, D.; P. Adhikari; J. A. Shin; J. H. Lee; Y. J. Kim; X. M. Zhu; J. N. Hu; J. Jin; C. C. Akoh y K. T. Lee (2010). *Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats*. LWT - Food Science and Technology. 43(3):458-464.
- López-López, A.; A. I. Castellote-Bargalló y M. C. López-Sabater (2001). *Direct determination by high-performance liquid chromatography of sn-2 monopalmitin after enzymatic lipase hydrolysis*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 760(1):97-105.
- Maruyama, T.; M. Nakajima; S. Ichikawa; H. Nabetani; S. Furusaki y M. Seki (2000). *Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. 77(11):1121-1126.
- Plank, C. y E. Lorbeer (1995). *Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography A. 697(1-2):461-468.
- Poole, C. F. (2003). *The essence of chromatography*. Amsterdam, Holanda, Elsevier Science B.V.
- Ratnayake, W. M. N. (2001). *Analysis of dietary trans fatty acids*. Journal of Oleo Science. 50:339-352.

- Ratnayake, W. M. N.; L. J. Plouffe; E. Pasquier y C. Gagnon (2002). *Temperature-sensitive resolution of cis- and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns*. Journal of AOAC International. 85(5):1112-1118.
- Ratnayake, W. M. N. (2004a). *Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver ion thin-layer chromatography, silver ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of AOAC International. 87(2):523-539.
- Ratnayake, W. M. N. (2004b). *Reliable methods for the determination of trans fatty acids and conjugated linoleic acid isomers: an overview*. Journal of AOAC International. 87(2):520-522.
- Ratnayake, W. M. N.; S. Hansen y M. Kennedy (2006). *Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 83(6):475-488.
- Restek. <http://www.chromspec.com/pdf/e/rk86.pdf>. Último acceso: 12/12/2011.
- Rezanka, T. y P. Mares (1991). *Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 542(0):145-159.
- Santana, A.; X. Fernández; M. A. Larrayoz y F. Recasens (2008). *Vegetable fat hydrogenation in supercritical-fluid solvents: Melting behavior analysis by DSC and NMR*. The Journal of Supercritical Fluids. 46(3):322-328.
- Sathivel, S.; W. Prinyawiwatkul; I. Negulescu y J. King (2008). *Determination of melting points, specific heat capacity and enthalpy of catfish visceral oil during the purification process*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85(3):291-296.
- Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/fatty-acid-methyl-ester/fame-capillary-columns/fame-mix-100m-sp2560.html>. Último acceso: 12/12/2011.
- Supelco (2007 - 2008). *Productos de cromatografía para análisis y purificación (Catálogo de productos)* Pág. 324.
- Whatman. <http://www.whatman.com/QualitativeFilterPapersStandardGrades.aspx>. Último acceso: 08/12/2011.
- Wolff, R. y C. Bayard (1995). *Improvement in the resolution of individual trans-18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography: Use of a 100-m CP-Sil 88 column*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(10):1197-1201.
- Wolff, R. L.; N. A. Combe; D. Precht, J. Molquentin; W.M.N. Ratnayake (1998). *Accurate determination of trans-18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography on cyanoalkyl polysiloxane stationary phases*. Oléagineux, Corps Gras, Lipides. 5:295-300.



# 3. ESTUDIO DE LA REACCIÓN MEDIANTE DISEÑO DE EXPERIMENTOS

---

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han llevado a cabo estudios de interesterificación entre aceite de soja y este mismo hidrogenado, ya sea mediante catálisis química (List et al., 1995; Petrauskaite et al., 1998; Ribeiro et al., 2009) o enzimática (Zhang et al., 2004). En este último trabajo se estudió el contenido de grasa sólida como parámetro físico para la evaluación de los productos de la interesterificación, sin llevar a cabo ningún tipo de análisis de la composición química de los mismos.

A diferencia de la mayoría de los trabajos publicados sobre el tema en los cuales se mantiene variable únicamente la relación de sustratos o, en caso de considerar mayor cantidad de factores, éstos se modifican de a uno por vez, en el presente capítulo se planteó estudiar la influencia simultánea de un número considerable de parámetros de reacción sobre la interesterificación enzimática de aceite de soja y aceite de soja hidrogenado en sistemas libres de solvente mediante diseño de experimentos.

Los diseños factoriales fraccionarios (FFD) se aplican ampliamente a experimentos que involucran varios factores, en los cuales es necesario estudiar el efecto conjunto de los mismos sobre las respuestas de interés. Permiten estimar los efectos de un factor cuando el resto de los mismos se encuentran en diferentes niveles (Montgomery, 2005); de esta manera es posible lograr no sólo la estimación de los efectos que posee cada factor sobre la respuesta en estudio de manera independiente, sino también la de las posibles interacciones entre ellos. Es importante aclarar que las conclusiones que se obtienen son válidas únicamente en el dominio experimental definido al llevar a cabo los experimentos.

Su ventaja principal respecto a la metodología clásica del diseño factorial completo, que implica la modificación de un factor por vez, es que el FFD consume mucho menos tiempo y trabajo experimental (Montgomery, 2005). Por supuesto que para obtener dichas ventajas se debe “pagar cierto precio”. Éste está relacionado con el hecho de que, dependiendo de la resolución del FFD elegido, ciertos efectos

principales e interacciones se encuentran confundidos. Es decir que el valor numérico obtenido para un determinado efecto que se encuentra confundido con otro es en realidad la suma de ambos, sin ser posible distinguir el grado de contribución que cada uno de ellos posee.

Cuando sólo se encuentran involucrados dos niveles para cada factor se asume que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango definido por dichos niveles, aunque el agregado de términos de interacción a los correspondientes a los efectos principales contribuye a aportar cierta curvatura a la función respuesta, obteniéndose así un plano arqueado (Montgomery, 2005).

Se estableció como primer objetivo analizar la influencia de los parámetros de reacción considerados (y sus interacciones) sobre el punto de fusión y la generación de subproductos durante la interesterificación enzimática de las mezclas binarias de aceite de soja (SO) y aceite de soja hidrogenado (HSO). El punto de fusión (mp) constituye una propiedad física útil, representativa y fácil de medir, mientras que los productos secundarios de cualquier reacción definen su rendimiento. En el caso de los productos de la interesterificación juegan además un papel importante en las propiedades del producto final. Los ácidos grasos libres (FFA) poseen un efecto definitivamente adverso ya que contribuyen al deterioro de la calidad del mismo favoreciendo su oxidación; por este motivo a nivel industrial son eliminados luego del proceso de interesterificación. En el caso de los monoglicéridos (MAG) y diglicéridos (DAG), su presencia en cantidades controladas puede resultar beneficiosa. Los MAG son utilizados en la producción de margarina con el fin de estabilizar la emulsión agua en grasa (Zainal y Yusoff, 1999). En el caso de los DAG, su presencia puede retardar la cristalización y, por ende, disminuir el contenido de grasa sólida de los productos interesterificados. Sin embargo, éstos pueden poseer cierta acción beneficiosa: se demostró que son capaces de estabilizar los cristales en margarinas elaboradas a base de aceites hidrogenados de colza y soja (Wiedermann, 1978).

Luego, se planteó un segundo objetivo consistente en la optimización de ambas respuestas a partir del ajuste de los datos experimentales a modelos de regresión múltiple.

Por último, se decidió realizar un estudio detallado de la relación entre el mp de los productos y los componentes mayoritarios de los mismos. Los diferentes grupos de triglicéridos (TAG) constituyentes de las grasas y aceites son los responsables de sus propiedades funcionales: los trisaturados (SSS) proveen estructura; los monoinsaturados-disaturados (SUS) proporcionan estructura y lubricidad y los triinsaturados (UUU) proveen únicamente lubricidad (O'Brien, 1998). Por otro lado, los productos secundarios de las reacciones de interesterificación, además de las propiedades mencionadas anteriormente, pueden poseer un marcado efecto en las propiedades físicas de los productos (Timms, 1985). Las margarinas, shortenings y demás productos grasos deben formularse teniendo en cuenta principalmente la relación entre ciertas propiedades físicas y la composición química de los mismos. Esta consideración debe estar acompañada del conocimiento de los efectos del procesamiento (O'Brien, 1998). Varios autores han relacionado el mp de muestras interesterificadas química o enzimáticamente con su composición química (Ghosh y Bhattacharyya, 1997; List et al., 1997; Ribeiro et al., 2009; Silva et al., 2009; da Silva et al., 2010), pero ninguno de ellos ha desarrollado modelos matemáticos capaces de representar esta relación. En el presente capítulo se hace uso de la gran cantidad de datos experimentales obtenidos a partir del diseño experimental para establecer modelos de regresión múltiple que permitan establecer dicha relación.

### 3.2. PLANTEO DEL DISEÑO

Se decidió analizar el efecto de siete factores sobre la reacción en estudio: tipo de enzima, concentración de enzima, tiempo de reacción, relación de sustratos (SO:HSO), temperatura, nivel de agitación y humedad. Se consideraron dos niveles para cada uno de ellos, denotados como (-1) y (1) en escala codificada (Tabla 3.1.).

**Tabla 3.1.** Factores y niveles para el diseño experimental  $2_{IV}^{7-2}$ .

	Nivel inferior (-1)	Nivel superior (+1)
A) Concentración de enzima (% m/m <sub>sust.</sub> )	5	10
B) Tipo de enzima	Lipozyme RM IM	Lipozyme TL IM
C) Tiempo (h)	1	24
D) SO:HSO (% m/m)	30:70	70:30
E) Temperatura (°C)	65	75
F) Nivel de agitación (rpm)	230	520
G) Humedad del sistema (% m <sub>tamices molec./m<sub>sust.</sub></sub> )	10	0

Los niveles fueron seleccionados luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica (Forssell et al., 1992; Foglia et al., 1993; Ferrari et al., 1997; Ghosh y Bhattacharyya, 1997; Fomuso y Akoh, 1998; Moussata y Akoh, 1998; Seriburi y Akoh, 1998a, b; Zainal y Yusoff, 1999; Pal et al., 2001; Zhang et al., 2001; Torres et al., 2002; Abigor et al., 2003; Zhang et al., 2004; Rønne et al., 2005), teniendo en cuenta además aspectos particulares del sistema en estudio. En cuanto a las enzimas seleccionadas, éstas fueron las más frecuentemente utilizadas en la literatura, al igual que sus concentraciones. Para el factor tiempo se seleccionaron dos niveles extremos, uno que permitiera evaluar los estados iniciales de la reacción y el nivel superior que ofreciera información acerca de los finales. Con respecto a la relación de sustratos, nuevamente se eligieron valores extremos con el objetivo de monitorear un amplio rango de esta variable. Los niveles de temperatura se definieron en función de las temperaturas óptimas de las enzimas utilizadas y fijando el nivel inferior en un valor mayor al punto de fusión de la grasa para evitar problemas de transferencia de masa. Los niveles de agitación y humedad se establecieron según valores encontrados en la literatura. Los correspondientes a la humedad del sistema fueron definidos por la masa de tamices moleculares agregados a la mezcla de reacción y no al contenido de agua del mismo. Esto se debe a que ambos sustratos y enzimas poseen diferentes niveles de humedad, por lo que, al ser agregados en diferentes proporciones en los distintos experimentos, sería imposible establecer únicamente dos niveles de humedad.

Las respuestas consideradas fueron también siete: punto de fusión, generación de subproductos, contenido de SSS, SUS, UUS, UUU y la suma de las concentraciones de MAG y DAG, denotada como MAG+DAG. La generación de subproductos se definió como la diferencia entre la suma de FFA, MAG y DAG en el producto de interesterificación y en una muestra control, es decir una mezcla de reacción en las mismas condiciones pero sin el agregado de enzima.

Si se hubiera planteado un diseño factorial completo el número de experiencias, considerando los duplicados correspondientes, hubiera ascendido a  $2 \times 2^7 = 256$ . Sin embargo, aplicando un FFD este número puede reducirse drásticamente. En el caso del diseño elegido,  $2_{IV}^{7-2}$ , la cantidad de experiencias descendió a  $2 \times 2^5 = 64$ ; lográndose así una reducción del 75%. El subíndice IV denota la *resolución* del diseño. Un diseño es de resolución R si ningún efecto que involucre p factores (si  $p = 1$ , el efecto es principal; mientras que si  $p > 1$ , éste se convierte en una interacción de p factores) se encuentra confundido con otro efecto que contenga menos de  $(R - p)$  factores (Montgomery, 2005). En este caso, el diseño elegido es de resolución IV, es decir que ningún efecto principal se encuentra confundido con ninguna interacción (usualmente se desprecian las interacciones de tres factores y órdenes superiores); mientras que ciertas interacciones de dos factores se confunden entre sí. Por lo tanto, en la elección de un FFD, un criterio razonable es el de elegir aquellos cuya resolución sea máxima. Pero este criterio no es suficiente muchas veces para garantizar el máximo aprovechamiento de la información suministrada por un diseño. Otro concepto relacionado con la resolución de un diseño es su *aberración*. Si la resolución indica el orden de los efectos que se encuentran confundidos, la aberración está relacionada con el número de estos efectos que presentan confusión. La minimización de la aberración de un diseño de resolución R asegura que el diseño tenga la mínima cantidad de efectos principales confundidos con interacciones de orden  $(R - 1)$ , el mínimo número de interacciones de dos factores confundidos con interacciones de orden  $(R - 2)$ , etc. (Montgomery, 2005).

El diseño elegido cumplió con esta condición y sólo tres interacciones de dos factores se confundieron: CE = FG, CF = EG y CG = EF (ver Tabla 3.1). En los casos en que alguno de estos pares de interacciones resultó significativo, se evaluó

criteriosamente la posibilidad de que una de ambas interacciones involucradas fuera despreciable frente a la otra, de manera de eliminar la confusión.

Las experiencias realizadas como resultado del diseño experimental FFD, con especificación de las respectivas variables, se muestra en la Tabla 3.2. Cabe destacar que los experimentos se realizaron por duplicado y en forma aleatoria, de manera de minimizar la ocurrencia de errores experimentales.

**Tabla 3.2.** Niveles del total de experiencias del FFD.

Exp. nº	Factores <sup>A</sup>						
	A	B	C	D	E	F	G
1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	-1	1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	-1	1
16	1	1	1	1	-1	1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1	1	-1
18	1	-1	-1	-1	1	-1	1
19	-1	1	-1	-1	1	-1	1
20	1	1	-1	-1	1	1	-1
21	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
22	1	-1	1	-1	1	1	1
23	-1	1	1	-1	1	1	1
24	1	1	1	-1	1	-1	-1
25	-1	-1	-1	1	1	-1	1
26	1	-1	-1	1	1	1	-1
27	-1	1	-1	1	1	1	-1
28	1	1	-1	1	1	-1	1
29	-1	-1	1	1	1	1	1
30	1	-1	1	1	1	-1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1
32	1	1	1	1	1	1	1

<sup>A</sup>Ver Tabla 3.1. para más detalles.



### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados utilizando el software Design-Ease® (Stat-Ease Inc., 2006). Se determinaron los efectos principales e interacciones de los 7 factores sobre cada una de las 7 respuestas para luego evaluar su significancia estadística aplicando análisis de varianza (ANOVA,  $P \leq 0.05$ ). Posteriormente se obtuvieron modelos de regresión lineal múltiple según la Ec. (3-1).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^7 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^7 \sum_{j=i+1}^6 \beta_{ij} x_i x_j \quad (3-1)$$

Donde:

$\hat{y}$  es la respuesta en estudio.

$x_i$  representa los niveles de cada uno de los factores considerados (en variable codificada).

$\beta_0$  es la ordenada al origen.

$\beta_i$  es el coeficiente del efecto principal del factor  $i$ .

$\beta_{ij}$  es el coeficiente de interacción del modelo para la interacción entre el factor  $i$  y el  $j$ .

La etapa de validación de los modelos en los procedimientos de análisis de datos es tan importante como la de construcción de los mismos (Montgomery, 2005). Ésta se llevó a cabo determinando y evaluando ciertos coeficientes estadísticos (coeficientes de determinación  $R^2$  y  $R_{aj}^2$  y falta de ajuste LOF) y diferentes herramientas de diagnóstico para luego ser utilizados en la predicción de nuevos puntos del dominio experimental determinado.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es una medida del valor predictivo de la ecuación y se interpreta como el porcentaje de la variación total explicada por la regresión. Un  $R^2$  de 0.98 por ejemplo indica que, conociendo los valores de las variables independientes, el modelo será capaz de explicar un 98% de la variación de la variable dependiente. Un problema potencial que se presenta con este estadístico es que aumenta a medida que se agregan términos al modelo, aunque éstos no sean

significativos. El coeficiente de determinación ajustado ( $R_{aj}^2$ ) penalizará el agregado de términos innecesarios disminuyendo su valor. De esta manera, este estadístico se encuentra “ajustado” por el tamaño del modelo. Por último, el estadístico falta de ajuste (LOF) se relaciona con la variación de los datos experimentales alrededor del modelo ajustado. Si existe LOF ( $P < 0.05$ ) la variación de las réplicas alrededor de sus valores medios es significativamente menor que la variación de los puntos del diseño alrededor de su valor predicho.

La mayoría de los gráficos de diagnóstico analizados se utilizaron para evaluar si se verificaron las suposiciones inherentes a todo análisis de varianza. Éstos fueron: gráfico normal de los residuos, residuos versus valores predichos, valores predichos versus experimentales y gráfico de Box-Cox. Por otro lado, se estudió la influencia de cada experimento individual sobre el modelo de regresión, de manera de identificar posibles datos o conjuntos de datos que pudieran tener una influencia desproporcionada sobre la estimación de los parámetros.

Las predicciones obtenidas a partir de dichos modelos poseen una cierta incertidumbre asociada, por lo que siempre se acompañan de intervalos de predicción, contruidos de acuerdo a la Ec. (3-2).

$$\hat{y}(\mathbf{x}_0) - t_{\alpha/2, N-p} \sqrt{\hat{\sigma}^2 (1 + \mathbf{x}_0' (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{x}_0)} \leq y_0 \leq \hat{y}(\mathbf{x}_0) + t_{\alpha/2, N-p} \sqrt{\hat{\sigma}^2 (1 + \mathbf{x}_0' (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{x}_0)} \quad (3-2)$$

Donde:

$\mathbf{x}_0$  es el vector correspondiente a los niveles de las variables de regresión en el punto de interés (en variable codificada y siendo el primer elemento igual a 1).

$\mathbf{X}$  es la matriz de los niveles de las variables independientes para todas las experiencias.

$n$  es el total de observaciones.

$p$  es el número de términos presentes en el modelo.

$\hat{y}(\mathbf{x}_0)$  es la respuesta media estimada en  $\mathbf{x}_0$ .

$t_{\alpha/2, N-p}$  es el punto de  $(\alpha/2)\%$  para la distribución  $t$  de Student con  $(n-p)$  grados de libertad (en este caso se eligió  $\alpha = 0.01$ ).

$\hat{\sigma}^2$  es el estimador de la varianza del error.

El cálculo de los intervalos de predicción se realizó mediante el software Maple® 11.0 (Waterloo Maple Inc., 2007).

Para el estudio de la relación entre la composición química y el punto de fusión de los productos se ajustaron modelos de regresión no lineal. Las variables independientes consideradas fueron los contenidos de los cuatro grupos de TAG (SSS, SUS, UUS y UUU), la suma de la concentración de MAG y DAG (MAG+DAG) y las interacciones entre ellas. Se trabajó con el mismo nivel de significancia que en el caso de los modelos lineales ( $\alpha = 0.05$ ).

## 3.4. RESULTADOS

### 3.4.1. ANÁLISIS GENERAL DE LA COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos para las distintas experiencias. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de glicerol, indicando que no se alcanzó en ningún caso hidrólisis total, resultado esperable al utilizar enzimas *sn*-1,3 específicas. El contenido de productos secundarios para todos los controles (muestras sin enzima) fue similar, aproximadamente 0.95% de FFA, 0.15% de MAG y 1.3% de DAG, compatible con la composición inicial de los sustratos (ver sección 2.3).

**Tabla 3.3.** Composición de subproductos y mp correspondientes a los ensayos del FFD.

Exp no <sup>A</sup>	Composición de subproductos <sup>B</sup> (% m/m)			mp <sup>B</sup> (°C)
	FFA	MAG	DAG	
1	3.72 ± 0.08	0.43 ± 0.02	6.25 ± 0.20	61.5 ± 0.0
2	4.14 ± 0.56	0.49 ± 0.06	8.36 ± 0.22	59.0 ± 0.6
3	3.05 ± 0.33	0.28 ± 0.02	5.35 ± 0.52	60.7 ± 0.2
4	6.67 ± 0.47	0.72 ± 0.06	10.80 ± 1.02	54.8 ± 0.4
5	4.54 ± 0.40	0.34 ± 0.02	7.88 ± 0.72	56.8 ± 0.4
6	6.42 ± 1.99	0.87 ± 0.09	9.10 ± 0.08	56.3 ± 0.7
7	11.26 ± 3.72	1.79 ± 0.02	14.31 ± 1.35	51.8 ± 0.4
8	8.63 ± 0.50	1.70 ± 1.04	11.45 ± 0.94	57.2 ± 0.3
9	2.74 ± 0.24	0.25 ± 0.18	5.16 ± 0.37	57.7 ± 0.4
10	8.07 ± 0.80	0.91 ± 0.10	9.87 ± 0.95	52.4 ± 0.1
11	3.71 ± 0.27	0.56 ± 0.27	6.89 ± 0.11	58.5 ± 0.0
12	4.04 ± 1.41	0.59 ± 0.01	7.06 ± 0.41	53.3 ± 0.4
13	6.78 ± 1.30	0.75 ± 0.10	10.53 ± 0.16	43.5 ± 0.6
14	5.87 ± 1.48	0.94 ± 0.59	8.84 ± 0.82	45.3 ± 0.4
15	5.18 ± 0.48	0.90 ± 0.08	9.79 ± 0.72	43.7 ± 0.4
16	11.67 ± 0.51	1.76 ± 0.46	17.39 ± 0.79	47.7 ± 0.5
17	5.52 ± 0.53	0.56 ± 0.04	8.91 ± 0.87	58.3 ± 0.1
18	6.56 ± 0.34	0.79 ± 0.07	11.77 ± 1.15	50.8 ± 0.4
19	4.47 ± 0.66	0.52 ± 0.10	9.33 ± 0.93	58.8 ± 0.4
20	5.82 ± 0.03	0.55 ± 0.02	9.12 ± 0.27	56.1 ± 0.4
21	4.64 ± 0.41	0.71 ± 0.06	5.87 ± 0.50	57.3 ± 0.4
22	5.21 ± 0.59	0.63 ± 0.13	8.86 ± 0.49	55.0 ± 0.0
23	7.33 ± 0.66	1.14 ± 0.18	11.21 ± 0.93	56.8 ± 0.4
24	11.15 ± 1.09	1.53 ± 0.10	16.38 ± 1.56	53.5 ± 0.7
25	3.93 ± 0.30	0.39 ± 0.01	8.00 ± 0.81	58.0 ± 0.0
26	5.56 ± 0.13	0.59 ± 0.05	8.20 ± 0.74	49.5 ± 0.7
27	3.73 ± 0.10	0.37 ± 0.05	6.40 ± 0.63	53.8 ± 0.4
28	5.85 ± 1.40	0.55 ± 0.06	10.53 ± 0.86	50.5 ± 0.0
29	5.43 ± 1.53	0.96 ± 0.07	9.08 ± 0.63	46.7 ± 0.4
30	8.37 ± 0.80	1.09 ± 0.11	10.95 ± 1.08	44.3 ± 0.6
31	9.05 ± 0.91	1.32 ± 0.04	12.26 ± 1.18	47.5 ± 0.6
32	7.89 ± 1.23	1.18 ± 0.57	10.50 ± 0.62	44.5 ± 0.8

<sup>A</sup> Ver Tabla 3.1 para más detalles.<sup>B</sup> Valor promedio de 2 mediciones independientes ± desvío estándar.

**Tabla 3.4.** Composición en TAG correspondientes a los ensayos del FFD.

Exp n <sup>o</sup> <sup>A</sup>	Composición en TAG <sup>B</sup> (% m/m)			
	SSS	SUS	UUS	UUU
1	22.66 ± 1.52	37.86 ± 0.40	26.83 ± 2.34	12.65 ± 0.42
2	17.86 ± 2.69	41.86 ± 0.71	31.09 ± 1.26	9.19 ± 0.72
3	21.30 ± 8.86	40.62 ± 4.48	26.62 ± 5.44	11.45 ± 1.06
4	14.99 ± 0.39	45.35 ± 0.24	32.34 ± 0.54	7.31 ± 0.68
5	15.78 ± 1.36	46.19 ± 2.54	30.83 ± 1.69	7.20 ± 2.22
6	16.88 ± 3.21	43.88 ± 3.99	30.65 ± 4.25	8.58 ± 5.02
7	23.12 ± 1.54	45.14 ± 1.46	24.82 ± 0.32	6.92 ± 0.40
8	19.74 ± 2.03	46.90 ± 0.87	28.16 ± 0.45	5.20 ± 0.70
9	11.97 ± 0.31	18.39 ± 0.53	29.60 ± 1.33	40.04 ± 0.50
10	7.40 ± 0.09	17.77 ± 1.16	29.41 ± 0.28	45.41 ± 0.97
11	8.10 ± 2.01	20.16 ± 1.45	30.42 ± 0.27	41.32 ± 0.83
12	6.62 ± 0.30	19.29 ± 0.10	29.78 ± 0.42	44.31 ± 0.81
13	2.87 ± 0.53	22.34 ± 0.11	31.64 ± 0.79	45.15 ± 0.15
14	4.18 ± 0.16	21.97 ± 1.05	32.59 ± 1.27	41.26 ± 2.16
15	4.48 ± 1.07	21.98 ± 0.46	31.83 ± 0.76	41.71 ± 0.76
16	4.38 ± 0.22	23.05 ± 1.32	35.11 ± 0.86	37.47 ± 0.24
17	25.14 ± 0.00	37.09 ± 0.56	25.63 ± 0.41	12.14 ± 0.15
18	17.34 ± 2.08	45.43 ± 0.71	29.64 ± 2.04	7.58 ± 0.67
19	19.25 ± 3.58	42.46 ± 1.18	29.59 ± 2.38	8.70 ± 0.02
20	14.68 ± 1.98	41.75 ± 0.23	31.98 ± 0.96	11.59 ± 0.79
21	14.19 ± 1.37	42.50 ± 1.19	17.60 ± 0.27	25.71 ± 0.08
22	13.08 ± 0.20	49.57 ± 0.65	30.46 ± 0.80	6.89 ± 1.25
23	19.76 ± 1.08	48.07 ± 0.71	27.74 ± 0.92	4.44 ± 0.86
24	18.53 ± 0.99	46.90 ± 0.20	22.66 ± 0.46	11.92 ± 0.73
25	10.06 ± 0.76	16.56 ± 4.54	28.76 ± 1.02	42.68 ± 3.57
26	4.74 ± 1.06	19.84 ± 1.98	32.21 ± 0.05	43.21 ± 3.09
27	9.34 ± 1.46	18.91 ± 0.41	30.10 ± 0.74	41.65 ± 0.32
28	5.42 ± 0.24	20.68 ± 0.44	32.10 ± 0.29	41.80 ± 0.39
29	3.71 ± 0.39	22.58 ± 1.38	17.55 ± 0.52	58.16 ± 0.47
30	3.60 ± 0.05	21.45 ± 0.33	33.26 ± 0.27	41.69 ± 0.65
31	4.28 ± 0.72	21.82 ± 1.41	26.01 ± 2.96	47.94 ± 5.01
32	3.74 ± 0.53	18.94 ± 0.59	33.03 ± 0.37	44.30 ± 1.49

<sup>A</sup>Ver Tabla 3.1 para más detalles.<sup>B</sup>Valor promedio de 2 mediciones independientes ± desvío estándar. Valores referidos al total de TAG.

El contenido medio de FFA en los productos de reacción varió entre 2.74 y 11.67%<sup>1</sup>. Los menores valores obtenidos corresponden a las reacciones con el menor contenido de enzima y 1 h de reacción a la menor temperatura, ya sea en el nivel inferior o superior del resto de los factores. Los niveles más altos de FFA se obtuvieron con Lipozyme TL IM en presencia de tamices moleculares a 24 h de reacción, independientemente de los niveles en los que se ubicaban los restantes factores.

Con respecto al contenido de MAG, se determinaron cantidades relativamente bajas comparadas con los FFA y los DAG, en el rango de 0.25% a 1.79%, pero que representan valores de hasta más de diez veces superiores a los hallados en los sustratos originales. La relación MAG/DAG varió entre 0.09 y 0.20, con un valor inicial en los sustratos de alrededor de 0.16 y un valor promedio de 0.13 para todas las muestras. En general, los mayores valores se observaron a las 24 h de reacción sin el uso de tamices moleculares, independientemente de los niveles en los que se ubicaban los restantes factores.

El contenido de DAG se ubicó en el rango de 5.16 - 17.39%. Como era esperable, las máximas concentraciones de DAG se encontraron en aquellas muestras para las cuales el contenido de FFA también fue máximo, observándose una razonable correlación entre la producción de MAG y DAG y la producción de FFA en los productos.

Con respecto a la distribución de los TAG en los productos, ésta varió considerablemente, dependiendo principalmente de la relación SO:HSO de las mezclas reactivas iniciales. Para la totalidad de los productos con una relación de sustratos inicial de 30:70 se obtuvieron los siguientes valores promedio (% m/m): 18.39 para SSS, 43.85 de SUS, 27.92 de UUS y 9.84 para UUU; mientras que para las muestras cuya relación de sustratos se ubicó en su nivel superior, los correspondientes contenidos fueron (% m/m): 5.93, 20.11, 30.21 y 43.63. Al comparar la concentración de cada uno de los cuatro grupos de TAG analizados en los productos con igual relación inicial SO:HSO a 1 y 24 h, se observó que únicamente el contenido de TAG trisaturados en las muestras cuya relación SO:HSO era de 70:30 se modificó considerablemente (51% de

---

<sup>1</sup> Todas las concentraciones reportadas en el presente capítulo se encuentran expresadas en base masa.

reducción), mientras que los correspondientes a los restantes grupos no se modificaron significativamente. Por lo tanto, estos resultados indicarían que los principales cambios de composición en TAG ocurren durante las instancias iniciales de la reacción (en el Capítulo 4 se realiza un análisis más detallado de la evolución de los mismos en el tiempo).

La concentración de StStSt se estudió en particular debido a la propiedad que posee este TAG de impartir una sensación “cerosa” en la boca. En las muestras control en las que la relación de sustratos se ubicó en su nivel inferior (30% de aceite), su concentración rondaba el 17%, mientras que luego del proceso de interesterificación enzimática ésta descendió a 7.3 - 16.5%, dependiendo de las condiciones de reacción. Para el nivel superior de dicho factor, el contenido inicial fue de 8.3%, alcanzando luego valores que se ubicaron entre el 1.2 y el 8.0%. Estos resultados reflejan la marcada reducción que la redistribución de los FA producida por la interesterificación podría generar sobre el contenido de este TAG indeseable.

### 3.4.2. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE REACCIÓN

#### 3.4.2.1. EFECTOS PRINCIPALES E INTERACCIONES SOBRE $m_p$ Y GENERACIÓN DE SUBPRODUCTOS

Se estudió en particular el efecto de las diferentes variables del proceso y sus interacciones sobre las respuestas *punto de fusión  $m_p$*  y *generación de subproductos* debido a que representan parámetros claros de la performance del proceso y la calidad del producto final. Los resultados del ANOVA para ambas respuestas se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** ANOVA para las respuestas mp y generación de subproductos.

Fuente	Generación de subproductos (% m/m)		mp (°C)	
	Cuadrados Medios	Valor P	Cuadrados Medios	Valor P
Modelo	1843.73	< 0.0001	1812.42	< 0.0001
A) Concentración de enzima	245.95	< 0.0001	106.35	< 0.0001
B) Tipo de enzima	207.55	< 0.0001	0.70	0.0518
C) Tiempo	571.86	< 0.0001	459.57	< 0.0001
D) SO:HSO	10.52	0.1794	724.28	< 0.0001
E) Temperatura	8.47	0.2274	22.21	< 0.0001
F) Nivel de agitación	29.95	0.0260	3.20	0.0001
G) Humedad del sistema	15.18	0.1083	0.08	0.4948
Interacciones				
AB	-	-	11.14	< 0.0001
AC	9.05	0.2124	103.79	< 0.0001
AE	-	-	37.67	< 0.0001
AF	26.54	0.0356	8.93	< 0.0001
AG	0.43	0.7830	23.89	< 0.0001
BC	277.19	< 0.0001	-	-
BD	43.47	0.0080	3.38	< 0.0001
BE	-	-	2.52	0.0005
BF	-	-	1.24	0.0112
BG	27.24	0.0333	-	-
CD	-	-	192.17	< 0.0001
CE	34.65	0.0171	40.16	< 0.0001
CG	250.05	< 0.0001	3.20	0.0001
DE	-	-	1.13	0.0150
DG	-	-	0.83	0.0349

Con respecto a la respuesta *generación de subproductos*, los resultados del ANOVA (Tabla 3.5.) muestran que sólo 10 efectos principales e interacciones fueron considerados significativos; siendo C (tiempo), BC, CG = EF, A (concentración de enzima) y B (tipo de enzima) en el orden presentado, los más significativos (representando el 84.2% de los cuadrados medios de factores e interacciones). En cuanto al par de interacciones que presentó confusión se le atribuyó a la interacción CG el efecto determinado. Dicha confusión se resolvió teniendo en cuenta que el factor tiempo resultó poseer una influencia notablemente mayor al resto de los



factores sobre la respuesta en estudio, incluso considerablemente mayor al factor significativo del restante par de interacciones confundido (F).

Analizando los tres efectos principales que resultaron tener significancia estadística, sus niveles superiores aumentaron la generación de productos secundarios. Esto significa que Lipozyme TL IM genera más productos secundarios que Lipozyme RM IM en el dominio experimental estudiado. La concentración de enzima tuvo un efecto positivo sobre la respuesta en cuestión, probablemente debido en parte al agua incorporada por la enzima (Forssell et al., 1992; Zhang et al., 2001; Criado et al., 2008). Cuando el factor tiempo se situó en su nivel inferior ambas enzimas se comportaron de manera similar con respecto a esta respuesta; mientras que a 24 h se obtuvo una mayor concentración de subproductos con Lipozyme TL IM que con RM IM. Es decir que con esta última es posible obtener productos más puros. Lipozyme TL IM se encuentra soportada sobre partículas de gel de sílice. Du et al. (2005) demostraron el efecto que este material posee sobre la migración de ácidos grasos durante la producción de biodiesel. El fenómeno de acil migración implica el desplazamiento espontáneo de un ácido graso de la posición *sn*-2 a alguna de las posiciones externas dentro de la misma molécula de MAG o DAG, con el fin de alcanzar una configuración termodinámicamente más estable (Serdarevich, 1967). Considerando la preferencia que poseerían ambas enzimas por actuar sobre las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol, cierta fracción de los 1,3-DAG resultantes de la migración no tendrían oportunidad de ser directamente reesterificados a TAG, contribuyendo a la generación de productos secundarios.

En el caso de la interacción CG (tiempo - humedad del sistema), para 1 h de reacción, los sistemas con humedad reducida presentaron menor generación de subproductos, seguramente debido a la menor concentración de moléculas de agua para iniciar el paso de hidrólisis de FA. Contrariamente, luego de 24 h de reacción, la generación de productos secundarios en dichos sistemas resultó ser mayor que en los correspondientes al nivel superior de humedad, principalmente en presencia de Lipozyme TL IM. Se encuentra fuera de discusión que la reducción del contenido de humedad, hasta cierto límite, en reacciones catalizadas por lipasas limita la etapa de hidrólisis, generando menor cantidad de productos secundarios. Por lo tanto, el

resultado obtenido resultó ser opuesto al esperado. Se podría pensar en algún tipo de interacción entre el tamiz y los diferentes sustratos y productos de la reacción; o, más aún, con las enzimas o soportes de los biocatalizadores, ya que los resultados difirieron al utilizar una u otra enzima. Por otro lado, si se considera que durante las instancias iniciales de la reacción el equilibrio se encuentra favorecido hacia la hidrólisis (ver Capítulo 4), la concentración de agua del sistema disminuiría no sólo como consecuencia del mecanismo de adsorción por parte de los tamices moleculares, sino también del consumo necesario para el desarrollo de dicha reacción. Las enzimas, debido a su condición proteica, requieren la presencia de una mínima cantidad de agua de manera de mantener su estructura tridimensional y, por ende, su actividad catalítica (Lortie, 1997; Paiva et al., 2000). En consecuencia, se podría plantear la hipótesis de una posible reducción excesiva del contenido de agua en el sistema para tiempos mayores a 1 h de reacción. Esto podría generar un cambio en la conformación de las enzimas, disminuyendo su capacidad de reesterificar las especies presentes en el medio. Definitivamente este resultado merecería un estudio más profundo de los posibles mecanismos que pudieran estar actuando. Torres et al. (2002) encontraron que la presencia de tamices moleculares en igual concentración favorecía la interesterificación enzimática catalizada por Lipozyme TL IM a 45°C entre aceite de girasol y triestearina, obteniendo mayores rendimientos que en ausencia de dichos secuestrantes de humedad. Sin embargo, el patrón de TAG obtenido en ambas condiciones difiere, permitiendo suponer que poseen algún efecto adicional sobre la reacción. Los resultados obtenidos en la presente tesis no concuerdan con dichas conclusiones. Fernandez-Lafuente (2010) realiza una revisión de los usos de la lipasa de *Thermomyces Lanuginosa*, citando una importante cantidad de trabajos en los cuales se utilizó la misma. Dicho autor concluye que los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación son, en muchos casos, heterogéneos e incluso contradictorios. El mismo postula que dichas discrepancias podrían ser atribuidas a lo sencillo que resulta la alteración de las propiedades de la lipasa como consecuencia de cambios en la preparación del biocatalizador, condiciones experimentales o naturaleza de los sustratos. En consecuencia, las discrepancias encontradas podrían atribuirse a las diferentes condiciones de reacción presentes en ambos sistemas.

Los resultados del ANOVA para la respuesta *mp* arrojaron una importante cantidad de efectos principales (concentración de enzima A, tiempo C, relación SO:HSO D, temperatura E y nivel de agitación F) e interacciones (AB, AC, AE, AF, AG, BD, BE, BF, CD, CE = FG, CG = EF, DE y DG) significativos. Sin embargo, los factores relación de sustratos (D), tiempo (C) y la interacción entre ellos contribuyeron al 75.9% del total de cuadrados medios de los factores e interacciones. El factor concentración de enzima (A) y su interacción con el factor tiempo (C) presentaron una contribución del 11.6%, mientras que las contribuciones del resto de los factores e interacciones estadísticamente significativos no superaron el 2.5%, presentando limitada significancia práctica.

Forsell et al. (1992) encontraron que durante la interesterificación enzimática entre sebo y aceite de colza con una enzima de *Mucor miehei* el tiempo, la concentración de enzima y la temperatura redujeron el *mp* de los productos; resultados que concuerdan con los obtenidos aquí para la interesterificación enzimática entre SO y HSO. La humedad del sistema y el tipo de enzima fueron los únicos factores que no resultaron ser estadísticamente significativos por sí mismos. Sin embargo, al estar presentes en más de una interacción significativa, sería erróneo despreciar completamente sus efectos.

Se sabe que la interesterificación reduce el *mp* de las correspondientes mezclas de sustratos, no sólo como consecuencia de la modificación del perfil de TAG, sino también como resultado de la generación de glicéridos parciales (Ghazali et al., 1995; Osório et al., 2001). Por lo tanto, el resultado obtenido, que indica que el factor tiempo posee un efecto reductor del *mp*, coincide con dicha afirmación.

Lógicamente, el factor D (relación de sustratos) tuvo un efecto negativo sobre el punto de fusión, es decir que una mayor proporción de aceite en la mezcla condujo a un menor *mp* en los correspondientes productos interesterificados. Cuando la relación de sustratos se ubicó en su nivel superior, la disminución en el *mp* con el tiempo fue más marcada. Cuando en la mezcla reactiva está presente una mayor proporción de grasa, pueden aparecer limitaciones de transferencia de masa y el paso de esterificación puede demorarse (Torres et al., 2002), aumentando la concentración

de productos secundarios en el medio. Si éste fuera el caso, el efecto de interacción debería haber sido opuesto; por lo que este hecho podría considerarse un indicio de la ausencia de limitaciones difusionales. Sin embargo, la comparación de los cambios en la composición en TAG para muestras en los niveles inferior y superior de relación de sustratos cuando el tiempo aumenta de 1 a 24 h podría explicar el efecto descrito. Como se mencionó anteriormente, en las muestras enriquecidas en aceite la disminución en SSS fue del 51%, mientras que el aumento de UUS fue sólo del 0.6% cuando el factor tiempo aumentó a su nivel superior. Por otro lado, para sistemas con alto contenido de grasa, los correspondientes cambios resultaron del 8 y 9% para SSS y UUS (los cambios porcentuales de UUU y SUS fueron similares para ambas condiciones y alrededor de 5 y 11%, respectivamente). A partir de estos resultados se puede concluir que los TAG trisaturados representan el principal grupo de TAG responsables de la reducción del mp.

En cuanto al factor A (concentración de enzima), ésta presentó una correlación negativa con la respuesta en estudio; es decir que a mayor contenido de catalizador, el mp de los productos obtenidos descendió. Como se expuso anteriormente, los cambios en la composición química generados por la interesterificación disminuyen el mp de los productos, así como estos cambios aumentan con la concentración de enzima. En cuanto a la interacción que presentó con el factor tiempo, se observó que a las 24 h de reacción el mp obtenido para ambos contenidos de lipasa resultó aproximadamente el mismo; mientras que para 1 h de reacción, el correspondiente a la menor concentración de enzima resultó ser mayor. Si a las 24 h la reacción alcanzó el equilibrio termodinámico, las composiciones de los productos igualmente podrían depender del tipo de catalizador utilizado y de la cantidad de agua que éste introduce al sistema. Sin embargo, el resultado encontrado indicaría que el aumento de la concentración de enzima no generaría cambios significativos en las composiciones globales de los productos, obteniéndose así mp comparables en ambas condiciones. Por otro lado, a 1 h de reacción en los sistemas con el doble de contenido enzimático (y, por ende, el doble de sitios activos) se generarán mayores cambios en la composición de las muestras, produciendo una mayor disminución en el mp de las mismas.

Realizando un análisis con respecto al factor nivel de agitación, se observó que éste resultó poseer cierta influencia sobre ambas respuestas, correlacionándose positivamente con la generación de subproductos y en forma opuesta con el mp. Un aumento en el nivel de agitación condujo a una mayor generación de productos secundarios y, por ende, a productos con menor mp. Como se mencionó anteriormente, si en el medio de reacción se presentan limitaciones de transferencia de masa, la velocidad de reesterificación se encuentra disminuida, generando así mayor formación de subproductos. Si éste hubiera sido el caso, el aumento en el nivel de agitación debería haber disminuido dicha respuesta; por lo tanto, se puede concluir que este tipo de fenómenos indeseables para la reacción en cuestión no se manifestaron, aún en las muestras con alto contenido de grasa y sometidas a menor temperatura. Por otro lado, una velocidad de agitación demasiado elevada podría causar la atrición del soporte. Este fenómeno genera mayor superficie de contacto entre los sustratos y el soporte del mismo, favoreciendo la migración de los ácidos grasos de los DAG en posición *sn-2* a las posiciones externas del glicerol, impidiendo la reesterificación directa hacia TAG por acción de las lipasas *sn-1,3* específicas.

Un análisis análogo de la temperatura conduciría a conclusiones similares. El hecho de que un aumento en la temperatura de reacción no haya modificado significativamente la generación de productos secundarios indicaría movilidades de las especies a reesterificar comparables a ambas temperaturas, descartando la existencia de problemas difusionales. Por otro lado, las enzimas, debido a su condición proteica, son susceptibles de sufrir desactivación térmica si se las expone a temperaturas elevadas. En este sentido, el resultado obtenido para el factor temperatura permitiría asegurar que, para ninguna de ambas enzimas, se presentó dicho fenómeno.

Por otro lado, la temperatura sí resultó poseer cierta influencia sobre el mp de los productos. Habiendo descartado la posibilidad de que el cambio detectado en dicha respuesta se haya debido a diferentes niveles de concentración de los subproductos de la reacción, se concluyó que el patrón de TAG de los diferentes productos de reacción resultó ser el responsable de las diferencias encontradas en dicha propiedad física. La temperatura de reacción puede afectar parámetros tales como afinidad de la enzima por los sustratos y preponderancia de reacciones

competitivas (Karabulut et al., 2009). En este trabajo dichos autores encontraron que un cambio en la temperatura de reacción generó selectividades diferenciales de Lipozyme RM IM y TL IM hacia la incorporación de diferentes ácidos grasos saturados en reacciones de acidólisis con trioleína. Este fenómeno podría explicar el efecto significativo de la temperatura (y sus interacciones con otros factores) sobre el punto de fusión de los productos.

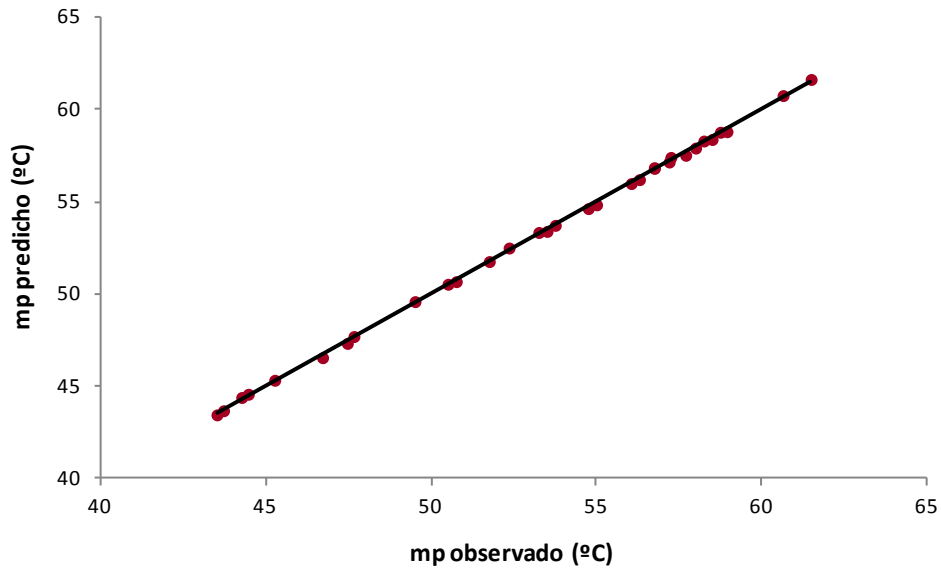
### 3.4.3. MODELADO

Según los diferentes efectos principales e interacciones que resultaron significativos sobre cada una de las respuestas se construyeron modelos de regresión lineal múltiple capaces de ajustar los datos experimentales. Algunos efectos principales que resultaron no significativos fueron igualmente considerados en los modelos para mantener la jerarquía de los mismos (Anderson y Whitcomb, 2007). Los coeficientes para los modelos *punto de fusión mp* y *generación de subproductos*, descritos por la Ec. (3-1), con sus correspondientes valores estadísticos, se presentan en la Tabla 3.6.

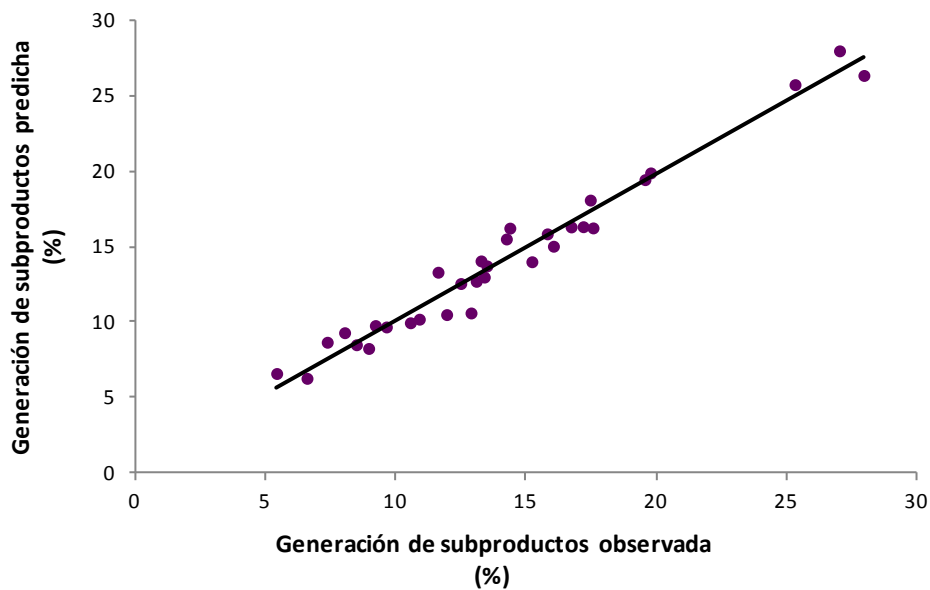
En las Figuras 3.1. y 3.2. se comparan los resultados experimentales con las predicciones del modelo para el punto de fusión y la generación de subproductos, respectivamente. Puede observarse que existe una excelente correlación entre los datos experimentales y los predichos por dichos modelos, como lo indican los estadísticos obtenidos para cada uno de ellos.

**Tabla 3.6.** Coeficientes de regresión de los modelos ajustados según Ec. (3-1).

Fuente	mp (°C)	Generación de subproductos (% m/m)
Intersección	53.14	14.10
A) Concentración de enzima	-1.29	1.96
B) Tipo de enzima	-0.11	1.80
C) Tiempo	-2.68	2.99
D) SO:HSO	-3.36	-0.41
E) Temperatura	-0.59	0.36
F) Nivel de agitación	-0.22	0.68
G) Humedad del sistema	0.04	-0.49
Interacciones		
AB	0.42	-
AC	1.27	-0.38
AE	-0.77	-
AF	0.37	-0.64
AG	-0.61	0.08
BC	-0.06	2.08
BD	0.23	-0.82
BE	0.20	-
BF	0.14	-
BG	-	-0.65
CD	-1.73	-
CE	0.79	-0.74
CG	0.22	-1.98
DE	0.13	-
DG	0.11	-
R <sup>2</sup>	0.9964	0.8763
R <sub>aj</sub> <sup>2</sup>	0.9940	0.8305
LOF (valor P)	0.7224	0.7160



**Figura 3.1.** Valores predichos por el modelo de regresión propuesto (Tabla 3.6.) versus valores experimentales para la respuesta mp.



**Figura 3.2.** Valores predichos por el modelo de regresión propuesto (Tabla 3.6.) versus valores experimentales para la respuesta mp.

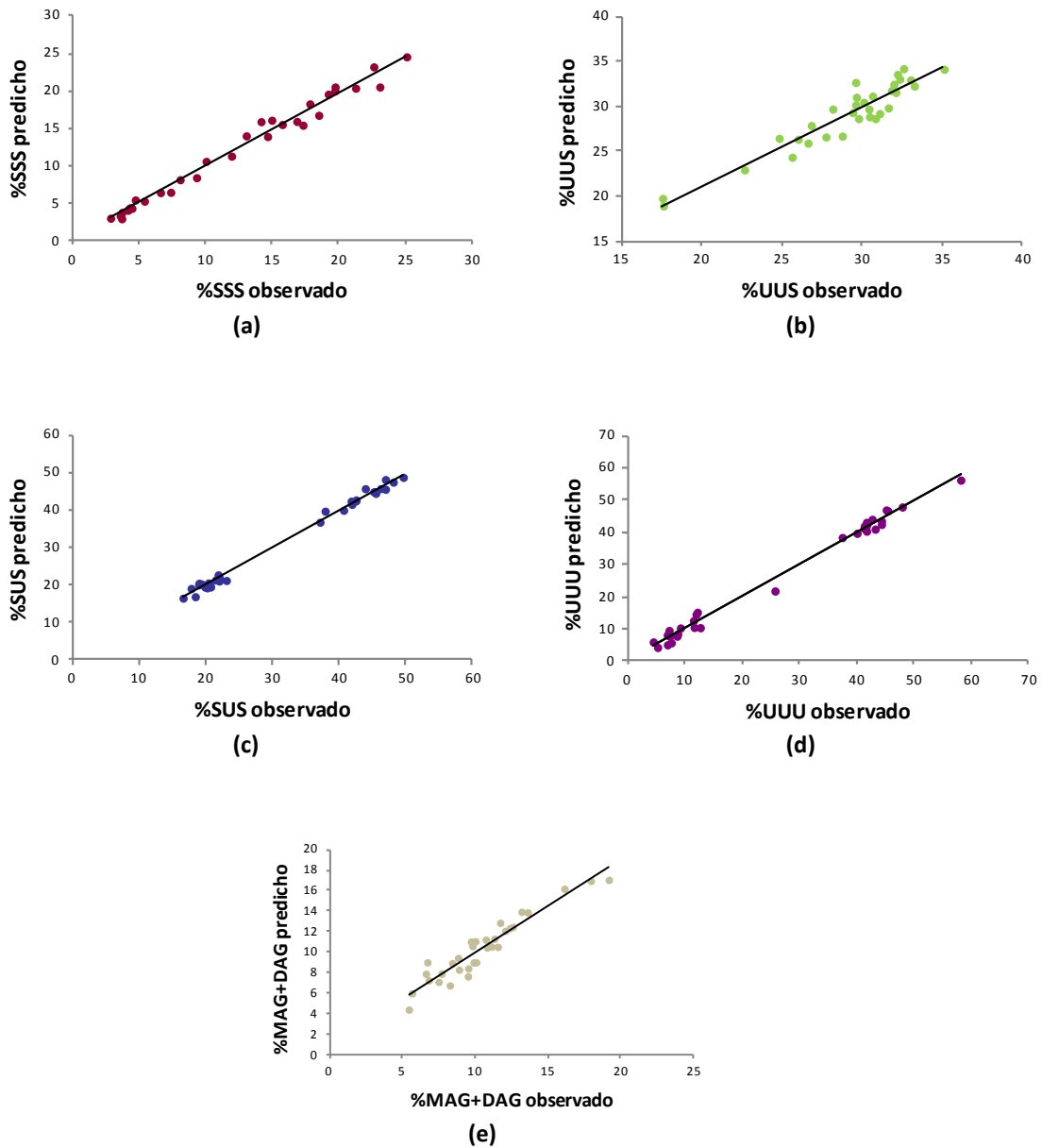
Por otra parte, en la Tabla 3.7. se detallan los coeficientes de los modelos de regresión lineal múltiple obtenidos para las restantes respuestas: TAG considerando grado de insaturación (SSS, SUS, UUS, UUU) y MAG+DAG. Cabe aclarar que para el ajuste del modelo correspondiente al contenido de SSS, los datos ajustados debieron ser transformados previamente con el objetivo de cumplir con uno de los supuestos



del ANOVA, el cual requiere que los residuos se encuentren distribuidos normalmente con varianza constante. A continuación, en la Figura 3.3., se comparan gráficamente los valores experimentales con los valores predichos por los modelos. Al igual que para el caso de las dos respuestas analizadas anteriormente, se puede observar que los cinco modelos son capaces de reproducir satisfactoriamente las respuestas observadas en el dominio experimental seleccionado.

**Tabla 3.7.** Coeficientes de regresión de los modelos ajustados según Ec. (3-1).

Fuente	ln(%SSS)	%SUS	%UUS	%UUU	%MAG+DAG
Intersección	2.29	31.98	29.06	26.74	10.39
A) Concentración de enzima	-0.10	0.81	1.84	-1.25	1.11
B) Tipo de enzima	0.02	0.65	0.45	-1.24	1.12
C) Tiempo	-0.19	1.73	-0.69	0.42	1.61
D) SO:HSO	-0.60	-11.87	1.15	16.90	-0.11
E) Temperatura	-0.04	-	-1.04	1.41	0.25
F) Nivel de agitación	-0.02	-	0.31	-0.04	0.31
G) Humedad del sistema	-0.01	0.55	0.39	-0.70	-0.16
Interacciones					
AB	-	-0.58	-0.71	1.24	-
AC	0.10	-0.43	0.53	-1.24	-0.22
AD	-	-0.55	-	-	-
AE	-0.04	-	0.81	-0.77	-
AF	-	-	0.69	-	-0.43
AG	0.01	-	-	0.19	-0.09
BC	0.10	-0.25	-	-0.94	-
BD	-	-	-	-	-0.40
BE	-	-	0.68	-	-
BF	0.04	-	0.87	-1.09	-
BG	-	-0.11	0.74	-0.46	-0.38
CD	-0.15	-0.57	0.61	0.66	0.39
CE	0.00	-	-1.29	1.56	-0.54
CF	-	-	-	-0.63	-
CG	0.01	0.02	0.26	-0.32	-1.17
DE	-0.01	-	-	-	-
DF	-0.04	-	-0.58	0.99	-
DG	-	-0.83	-1.14	1.65	-
R <sup>2</sup>	0.9719	0.9870	0.8886	0.9932	0.8663
R <sub>aj</sub> <sup>2</sup>	0.9597	0.9833	0.8329	0.9893	0.8128
LOF (valor P)	0.68	0.66	0.27	0.16	0.73



**Figura 3.3.** Valores predichos por los modelo de regresión propuestos (Tabla 3.7.) versus valores experimentales para las respuestas (a) Contenido de SSS (% m/m), (b) Contenido de UUS (% m/m), (c) Contenido de SUS (% m/m), (d) Contenido de UUU (% m/m) y (e) Contenido de MAG+DAG (% m/m).

Los modelos fueron validados no sólo mediante los coeficientes estadísticos ( $R^2$ ,  $R_{aj}^2$  y LOF), sino también a través de diferentes herramientas de diagnóstico incluidos en el software utilizado, como gráfico normal de los residuos, residuos versus valores predichos y gráfico de Box-Cox. Las conclusiones obtenidas permitieron validar los modelos construidos otorgándoles un certero carácter predictor.

A pesar de que los modelos fueron ajustados a datos obtenidos únicamente en dos niveles de los factores, se llevaron a cabo experimentos en los puntos centrales de manera de descartar una posible desviación de la linealidad supuesta. Las condiciones experimentales se detallan a continuación: 7.5% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima, 12.5 h de reacción, relación SO:HSO de 50:50, 70°C, 375 rpm y 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de tamices moleculares. Para cada respuesta se construyeron dos intervalos de predicción según la Ec. (3-2), uno para cada tipo de enzima. Esto se debe a que el tipo de enzima es un factor categórico y no numérico, con lo cual no es posible que tome valores intermedios entre sus niveles inferior y superior. En la Tabla 3.8. se presentan dichos intervalos con los correspondientes valores observados. Los valores experimentales obtenidos para ambas respuestas verificaron la suposición de linealidad ya que cayeron dentro de los intervalos de predicción.

**Tabla 3.8.** Intervalos de predicción según Ec. (3-2) y valores observados para los puntos centrales del diseño.

	Lipozyme RM IM		Lipozyme TL IM	
	Intervalo de predicción	Valor observado	Intervalo de predicción	Valor observado
mp (°C)	51.92 - 54.58	52.27 ± 0.18	51.71 - 54.37	54.30 ± 0.06
Generación de subproductos (%)	5.07 - 19.54	16.89 ± 1.13	8.67 - 23.14	16.36 ± 2.12
SSS (%)	8.12 - 11.18	8.75 ± 0.19	8.55 - 11.61	11.38 ± 0.15
SSU (%)	26.58 - 36.08	34.83 ± 0.68	27.88 - 37.37	35.15 ± 0.44
UUS (%)	23.26 - 33.96	32.87 ± 0.65	24.16 - 34.87	29.41 ± 0.44
UUU (%)	22.17 - 33.77	23.55 ± 1.28	19.70 - 31.30	24.06 ± 0.75
MAG+DAG (%)	4.80 - 13.74	11.25 ± 2.20	7.04 - 15.99	12.36 ± 1.79

#### 3.4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN

Una vez verificada la validez de los modelos en todo el dominio experimental, se planteó llevar a cabo una optimización de las condiciones de reacción estableciendo como funciones objetivo la minimización de ambas respuestas, punto de fusión y generación de subproductos a partir de los sustratos utilizados. El primer objetivo surge de analizar el rango de valores de mp obtenido con el correspondiente a los productos comerciales disponibles en el mercado; el primero fue de 43.1 - 61.5°C,

mientras que el correspondiente a los productos comerciales es de aproximadamente 32.5 - 45.5°C (Petrauskaite et al., 1998). La minimización de la segunda respuesta está directamente relacionada con la intención de obtener el máximo rendimiento de TAG.

Los resultados de la optimización numérica arrojaron los siguientes niveles óptimos de los factores: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, una relación SO:HSO de 70:30 (% m/m), una temperatura de reacción de 65°C, 230 rpm como velocidad de agitación, ausencia de tamices moleculares y 24 h de tiempo de reacción. Los intervalos de predicción construidos en dicho punto del dominio experimental con los correspondientes valores observados para todas las respuestas se detallan en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9.** Intervalos de predicción según Ec. (3-2) y valores observados para el punto óptimo.

	Intervalo de predicción	Valor observado
mp (°C)	43.37 - 46.02	44.68 ± 0.55
Generación de subproductos (%)	3.57 - 18.05	15.33 ± 2.35
SSS (%)	2.28 - 5.34	4.04 ± 0.21
SSU (%)	16.15 - 25.64	22.30 ± 1.78
UUS (%)	25.40 - 36.11	32.39 ± 0.70
UUU (%)	40.33 - 51.94	41.27 ± 2.49
MAG+DAG (%)	4.79 - 13.74	11.73 ± 1.23

La totalidad de las respuestas observadas caen dentro de los correspondientes intervalos de predicción, reafirmando aún más la validez de los modelos ajustados. En cuanto al mp obtenido, Petrauskaite et al. (1998) reportaron un valor similar de mp (47°C) para productos de interesterificación química con similares sustratos y en la misma proporción.

Con respecto al contenido de triestearina en el producto obtenido en condiciones óptimas de reacción, su valor fue lo suficientemente bajo (1.7%) como para evitar la sensación “cerosa” que éste genera en la boca.

### 3.4.5. MODELADO DEL mp CON LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

La relación entre mp y la composición química de los productos de interesterificación enzimática se estudió mediante regresión lineal múltiple. Se consideraron cinco grupos de compuestos mayoritarios (SSS, SUS, UUS, UUU y MAG+DAG). El contenido de FFA no se incluyó en el análisis ya que las muestras fueron deacidificadas previo a la determinación del mp, de manera de reproducir lo más fielmente posible los tratamientos a los cuales se encuentran sometidos los productos a nivel industrial y, de esta manera, garantizar una cierta extrapolación de los resultados a los mismos.

Se propusieron varios modelos, los cuales incluían no sólo los términos correspondientes a cada una de las variables, sino también términos de interacción entre ellas, buscando acercarse al valor del coeficiente de determinación ajustado ( $R_{aj}^2$ ) al predictivo de la regresión ( $R^2$ ). Inicialmente se propusieron modelos lineales, pero a través del análisis de la distribución de los errores se observó una mejor representación de los datos cuando las variables independientes se afectaron por alguna potencia. La Ec. (3-3) describe un modelo propuesto que logró ajustar los datos experimentales satisfactoriamente ( $R^2 = 0.9990$ ,  $R_{aj}^2 = 0.9004$ ).

$$\begin{aligned} \text{mp} = & -204.00 + 210.23 \text{SSS}^{0.05} + 0.011 \text{UUU}^{1.5} - 2.069 (\text{MAG+DAG})^{0.05} \\ & + 26.29 \text{UUU}^{0.05} - 5.12 \text{SUS}^{0.05} - 0.009 (\text{SSS} (\text{MAG+DAG}))^{1.2} \end{aligned} \quad (3-3)$$

Las variables y la interacción consideradas en el modelo fueron linealizadas y normalizadas en el rango -1 a 1 con el fin de comparar sus contribuciones al modelo. La normalización se llevó a cabo teniendo en cuenta el rango de valores que presentó cada variable, previamente linealizada. El modelo obtenido de esta forma logró explicar el 99.10% de la variación del mp, resultando contribuciones altamente significativas las correspondientes a SSS y a la interacción SSS-MAG+DAG ( $P < 0.025$ ). Las contribuciones de las restantes variables no fueron consideradas estadísticamente significativas ( $P > 0.025$ ) (Tabla 3.10.).

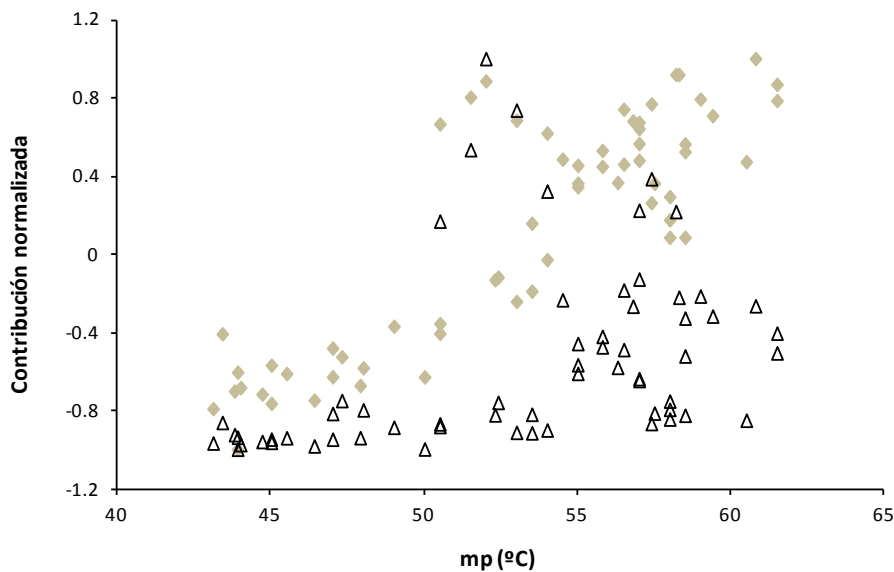
**Tabla 3.10.** Coeficientes de regresión según Ec. (3-3) y sus valores *P*.

Fuente <sup>A</sup>	mp <sub>T</sub> <sup>B</sup> (°C)		mp <sub>RMIM</sub> (°C)		mp <sub>TLIM</sub> (°C)	
	Coeficiente	Valor <i>P</i>	Coeficiente	Valor <i>P</i>	Coeficiente	Valor <i>P</i>
Intersección	48.62	< 0.0001	46.84	< 0.0001	48.45	< 0.0001
SSS <sub>N</sub>	14.04	< 0.0001	13.31	< 0.0001	16.90	0.0005
UUU <sub>N</sub>	2.32	0.545	-1.21	0.764	9.15	0.259
MAG+DAG <sub>N</sub>	-0,087	0.940	-0.400	0.815	0.449	0.813
UUS <sub>N</sub>	0.554	0.687	-0.583	0.690	2.83	0.347
SUS <sub>N</sub>	-0.199	0.939	-2.76	0.314	4.98	0.373
SSS – MAG+DAG <sub>N</sub>	-5.98	0.0003	-8.28	0.005	-6.06	0.029
R <sup>2</sup>	0.9910		0.9972		0.9797	
R <sub>aj</sub> <sup>2</sup>	0.9342		0.9483		0.8601	
LOF	0.31		0.80		0.38	

<sup>A</sup> N<sub>i</sub> variables de la Ec. (3-3) linealizadas y normalizadas.

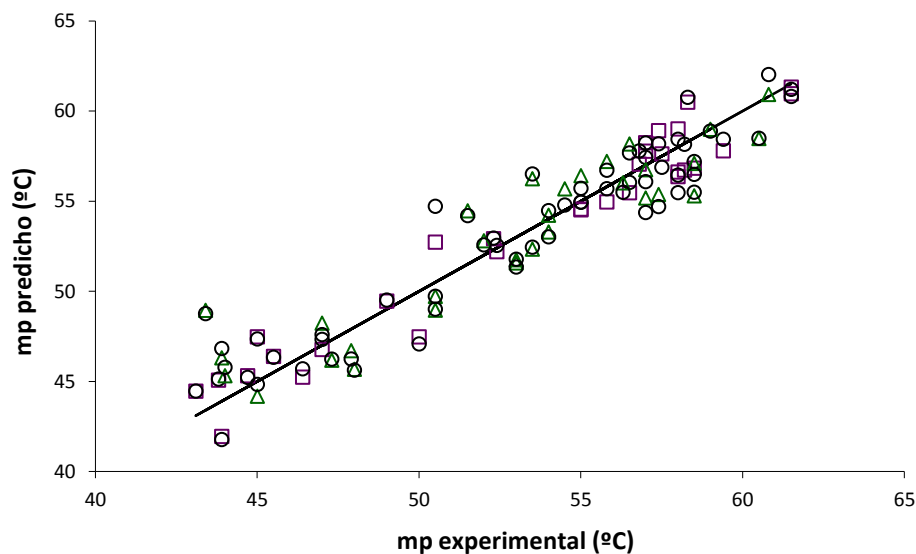
<sup>B</sup> T<sub>i</sub> ajuste realizado con el total de los experimentos; RMIM: ajuste realizado considerando sólo los experimentos con Lipozyme RM IM; TLIM, ajuste realizado considerando sólo los experimentos con Lipozyme TL IM.

Las contribuciones significativas sobre el mp pueden observarse en la Figura 3.4. A bajos contenidos de MAG y DAG (valores normalizados negativos), se observa una clara relación lineal entre %SSS y mp (ambas normalizadas y linealizadas). Por otro lado, a moderados y altos contenidos de dichos subproductos, la variación en mp no puede ser completamente atribuida al contenido de SSS ya que el efecto de los MAG y DAG comienza a notarse. Si se considera que los mayores mp para los productos grasos comerciales rondan los 45°C, se podría asegurar que la mayor contribución al mp de dichos productos la poseen los TAG trisaturados.



**Figura 3.4.** Contribuciones normalizadas de SSS (◆) y la Interacción SSS-MAG+DAG (△) al mp.

Se realizó una discriminación de los datos según tipo de enzima y ambos grupos se ajustaron al modelo seleccionado (Tabla 3.10.). A partir del ajuste de los datos obtenidos con Lipozyme RM IM se obtuvieron los mismos factores significativos que para el ajuste correspondiente al total de datos; mientras que sobre el mp de las muestras catalizadas con Lipozyme TL IM la interacción SSS-MAG+DAG no resultó tener un efecto significativo. En conclusión, el ajuste puede ser mejorado considerando la enzima utilizada, aunque el ajuste general puede ser utilizado sin perder demasiada correlación entre los datos (Figura 3.5.).



**Figura 3.5.** Relación entre mp predicho y experimental utilizando: todos los valores en un modelo general (O), valores ajustados para Lipozyme RM IM (□) y TL IM (△).

### 3.5. CONCLUSIONES

El diseño de experimentos desarrollado en el presente capítulo permitió cumplir con el objetivo principal planteado inicialmente, el cual consistía en estudiar la relación existente entre las variables del proceso de interesterificación enzimática de mezclas binarias de aceite de soja y aceite de soja hidrogenado y ciertas propiedades y composiciones características de los productos finales. Se demostró la ventaja de utilizar un diseño factorial fraccionario ya que, para el caso analizado, un diseño de experimentos clásico, el cual consiste en determinar los efectos de las variables modificando una y manteniendo las restantes constantes, hubiera brindado información parcial respecto a dichos efectos debido a que estos diseños desprecian posibles interacciones entre las variables, algunas de las cuales resultaron ser estadísticamente significativas.

En la reacción en estudio se analizó el efecto de siete factores (concentración de enzima, tipo de enzima, tiempo de reacción, relación de sustratos, temperatura, nivel de agitación y humedad) sobre siete respuestas, dos características (punto de fusión y



producción de subproductos) y cinco referidas a la composición de triglicéridos (contenido de SSS, SUS, UUS y UUU), mono y diglicéridos (contenido de MAG+DAG).

En general, las condiciones de reacción de mayor importancia para obtener productos grasos semisólidos con las características deseadas y mínima generación de productos secundarios fueron: concentración y tipo de enzima, tiempo, relación de sustratos y contenido de agua del sistema. En particular, el tiempo de reacción, la relación SO:HSO y la concentración de enzima resultaron poseer la mayor influencia sobre el punto de fusión de los productos obtenidos; mientras que sobre la generación de subproductos los factores con mayor contribución fueron: tiempo, tipo y concentración de enzima y humedad del sistema.

La temperatura y el nivel de agitación del sistema no resultaron poseer un efecto significativo sobre ninguna de las respuestas estudiadas.

Fue posible predecir la combinación óptima de niveles de las variables de manera de lograr productos con características físicas comparables a los disponibles comercialmente y logrando un máximo rendimiento de TAG. La realización de ensayos de confirmación en dicho punto del dominio experimental validó esta conclusión.

Por último, se confirmó y modeló satisfactoriamente la alta contribución de la composición química de los productos sobre su punto de fusión, resultando el contenido de SSS y su interacción con la concentración de MAG+DAG las variables con mayor significancia estadística.

## 3.6. NOMENCLATURA

ANOVA: análisis de varianza.

CIE: interesterificación química.

DAG: diglicéridos.

DOE: diseño de experimentos.

EIE: interesterificación enzimática.

FFA: ácidos grasos libres.

FFD: diseño factorial fraccionario.

HSO: aceite de soja hidrogenado.  
IE: interesterificación.  
LOF: falta de ajuste.  
MAG: monoglicéridos.  
mp: punto de fusión.  
 $R^2$ : coeficiente de determinación.  
 $R_{aj}^2$ : coeficiente de determinación ajustado.  
SFC: contenido de grasa sólida.  
SO: aceite de soja refinado.  
SSS: TAG trisaturado.  
SUS: TAG disaturado/monoinsaturado.  
TAG: triglicéridos.  
UUS: TAG monosaturado/diinsaturado.  
UUU: TAG triinsaturado.

### 3.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abigor, R. D.; W. N. Marmer; T. A. Foglia; K. C. Jones; R. J. DiCiccio; R. Ashby y P. O. Uadia (2003). *Production of cocoa butter-like fats by the lipase-catalyzed interesterification of palm oil and hydrogenated soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 80(12):1193-1196.
- Anderson, M. J. y P. J. Whitcomb (2007). *DOE Simplified, Practical Tools for Effective Experimentation*. New York, Productivity Press.
- Criado, M.; E. Hernández-Martín; A. López-Hernández y C. Otero (2008). *Enzymatic interesterification of olive oil with fully hydrogenated palm oil: Characterization of fats*. European Journal of Lipid Science and Technology. 110(8):714-724.
- da Silva, R. C.; D. F. Soares; M. B. Lourenço; F. A. S. M. Soares; K. G. da Silva; M. I. A. Gonçalves y L. A. Gioielli (2010). *Structured lipids obtained by chemical interesterification of olive oil and palm stearin*. LWT - Food Science and Technology. 43(5):752-758.
- Design-Ease® 7.1 Versión educativa (2006). New York, Stat-Ease Inc.
- Du, W.; Y. Y. Xu; D. H. Liu y Z. B. Li (2005). *Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 37(1-6):68-71.
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). *Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62(3-4):197-212.
- Ferrari, R. A.; W. Esteves y K. D. Mukherjee (1997). *Alteration of steryl ester content and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols by chemical and enzymatic interesterification of plant oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(2):93-96.

- Foglia, T. A.; K. Petruso y S. H. Fearheller (1993). *Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 70(3):281-285.
- Fomuso, L. B. y C. C. Akoh (1998). *Structured lipids: Lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(3):405-410.
- Forssell, P.; R. Kervinen; M. Lappi; P. Linko; T. Suortti y K. Poutanen (1992). *Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 69(2):126-129.
- Ghazali, H. M.; S. Hamidah y Y. B. Che Man (1995). *Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(6):633-639.
- Ghosh, S. y D. K. Bhattacharyya (1997). *Utilization of high-melting palm stearin in lipase-catalyzed interesterification with liquid oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(5):589-592.
- Karabulut, I.; G. Durmaz y A. A. Hayaloglu (2009). *Fatty Acid Selectivity of Lipases during Acidolysis Reaction between Triolein and Saturated Fatty Acids Varying from Caproic to Behenic Acids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(16):7584-7590.
- List, G. R.; T. L. Mounts; F. Orthofer y W. E. Neff (1995). *Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(3):379-382.
- List, G. R.; T. L. Mounts; F. Orthofer y W. E. Neff (1997). *Effect of interesterification on the structure and physical properties of high-stearic acid soybean oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(3):327-329.
- Lortie, R. (1997). *Enzyme catalyzed esterification*. Biotechnology Advances. 15(1):1-15.
- Maple® 11.0 (2007). Ontario, Canadá, Waterloo Maple Inc.
- Montgomery, D. C. (2005). *Design and Analysis of Experiments*. EEUU, John Wiley & Sons, Inc.
- Moussata, C. O. y C. C. Akoh (1998). *Influence of lipase-catalyzed interesterification on the oxidative stability of melon seed oil triacylglycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(9):1155-1159.
- O'Brien, R. D. (1998). *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. Pennsylvania, EEUU, Technomic Publishing Company, Inc.
- Osório, N. M.; S. Ferreira-Dias; J. H. Gusmão y M. M. R. Da Fonseca (2001). *Response surface modelling of the production of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase*. Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic. 11(4-6):677-686.
- Paiva, A. L.; V. M. Balcão y F. X. Malcata (2000). *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. Enzyme and Microbial Technology. 27(3-5):187-204.
- Pal, P. K.; D. K. Bhattacharyya y S. Ghosh (2001). *Modifications of butter stearin by blending and interesterification for better utilization in edible fat products*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(1):31-36.
- Petrauskaite, V.; W. De Greyt; M. Kellens y A. Huyghebaert (1998). *Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification*

- of vegetable oil blends*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(4):489-493.
- Ribeiro, A. P. B.; R. Grimaldi; L. A. Gioielli y L. A. G. Gonçalves (2009). *Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications*. Food Research International. 42(3):401-410.
- Rønne, T. H.; L. S. Pedersen y E. Xu (2005). *Triglyceride selectivity of immobilized thermomyces lanuginosa lipase in interesterification*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 82(10):737-743.
- Serdarevich, B. (1967). *Glyceride isomerizations in lipid chemistry*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 44(7):381-393.
- Seriburi, V. y C. C. Akoh (1998a). *Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with candida antarctica lipase to produce plastic fats*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(10):1339-1345.
- Seriburi, V. y C. C. Akoh (1998b). *Enzymatic interesterification of triolein and tristearin: Chemical structure and differential scanning calorimetric analysis of the products*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(6):711-716.
- Silva, R. C.; L. N. Cotting; T. P. Poltronieri; V. M. Balcão; D. B. de Almeida; L. A. G. Goncalves; R. Grimaldi y L. A. Gioielli (2009). *The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil*. LWT - Food Science and Technology. 42(7):1275-1282.
- Timms, R. E. (1985). *Physical properties of oils and mixtures of oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 62(2):241-249.
- Torres, C. F.; F. Munir; C. Otero y C. G. Hill Jr (2002). *Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from thermomyces lanuginosa*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 79(8):775-781.
- Wiedermann, L. H. (1978). *Margarine and margarine oil, formulation and control*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 55(11):823-829.
- Zainal, Z. y M. S. A. Yusoff (1999). *Enzymatic interesterification of palm stearin and palm kernel olein*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(9):1003-1008.
- Zhang, H.; L. S. Pedersen; D. Kristensen; J. Adler-Nissen y H. C. Holm (2004). *Modification of margarine fats by enzymatic interesterification: Evaluation of a solid-fat-content-based exponential model with two groups of oil blends*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 81(7):653-658.
- Zhang, H.; X. Xu; J. Nilsson; H. Mu; J. Adler-Nissen y C. E. Høy (2001). *Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated thermomyces lanuginosa lipase in a large-scale study*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(1):57-64.

# 4. CINÉTICA DE LA REACCIÓN

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se presenta el estudio cinético de la reacción de interesterificación, esto es el análisis de la evolución en el tiempo de las concentraciones de las diferentes especies involucradas en dicha reacción. Tal como se mencionó en el Capítulo 1, la literatura ofrece limitada información respecto a este tema. Osborn y Akoh, (2002) aseguran que los parámetros que determinan el equilibrio de la reacción han sido ampliamente estudiados, a diferencia de lo que ocurre con los aspectos relacionados con la cinética de la misma; generándose así interesantes oportunidades para su estudio. Con respecto a los trabajos en los cuales se analizan las composiciones de equilibrio cuando el objetivo de la interesterificación enzimática consiste en la elaboración de productos grasos semisólidos puede destacarse el correspondiente a Silva et al. (2009), en el cual se utiliza como sustrato líquido aceite de soja refinado para interesterificar con grasa de cerdo haciendo uso de Lipozyme TL IM. Por otro lado, Li et al. (2010) interesterificaron químicamente aceite de girasol alto oleico con aceite de soja totalmente hidrogenado, utilizando la misma lipasa, para luego analizar la composición de los productos finales.

Respecto a trabajos en los cuales se haya monitoreado el cambio en la composición de mezclas grasas sometidas al proceso de modificación enzimática en estudio pueden citarse los correspondientes a Ronne et al. (2005), quienes utilizaron como sustratos grasa de manteca y aceite de colza, y el de Criado et al. (2007a), los cuales interesterificaron aceite de oliva extra virgen con aceite de palma totalmente hidrogenado. Por otro lado, una mezcla inicial de aceite de oliva con aceite de canola totalmente hidrogenado fue tratado enzimáticamente por Kim et al. (2008) evaluando el desarrollo de la reacción mediante el monitoreo del TAG mayoritario en los productos. Ibrahim et al. (2008) y Zhang et al. (2001) modificaron mezclas de estearina de palma y aceite de coco analizando las composiciones de los productos con el transcurso del tiempo, mientras que De Clercq et al. (2012) realizaron lo mismo sobre mezclas de aceite de palma y sus fracciones.

En este capítulo se analiza el efecto de las principales variable identificadas como significativas en el capítulo anterior, es decir: tipo y concentración de enzima y relación de sustratos. Para ambos sistemas se presentan los perfiles cinéticos correspondientes a los productos secundarios de la reacción, es decir diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG) y ácidos grasos libres (FFA), así como también las curvas correspondientes a las concentraciones de triglicéridos totales (TAG) y de los distintos grupos de TAG (SSS, SUS, UUS y UUU) en las mezclas reactivas. La información provista por estos últimos es especialmente importante ya que el análisis de la composición de triglicéridos representa un indicador único del proceso de reacomodamiento de los ácidos grasos y es extremadamente útil para monitorear la modificación de los productos interesterificados y definir aplicaciones específicas para ellos (Ribeiro et al., 2009). Se incluye asimismo un análisis respecto a las especies de TAG mayoritarias, el cual permite ahondar aún más en dicho aspecto, ya que ciertas propiedades físicas y funcionales de los productos grasos dependen de la presencia de ciertos TAG en particular (Neff et al., 1999). Por otro lado, el análisis de los mismos ofrece información respecto a la acción específica de las lipasas sobre los ácidos grasos presentes en dichos compuestos.

Se evalúa el comportamiento cinético de la reacción en ausencia y presencia de solvente. En este último caso también se estudia el efecto de la temperatura sobre la cinética de la reacción. El uso de solventes permite trabajar a menores temperaturas que en el caso de sistemas libres de los mismos, protegiendo a la enzima del fenómeno de desactivación térmica y, desde el punto de vista industrial, reduciendo los requerimientos energéticos del proceso. En caso de que los sustratos de la reacción se encuentren completamente líquidos a la temperatura de reacción seleccionada, el objetivo del agregado de un solvente al medio puede residir en que éste disminuye la viscosidad del mismo, facilitando así la movilidad de las especies reactantes y, en consecuencia, su acceso a la superficie del biocatalizador (Criado et al., 2007b) . Sin embargo, este tipo de procesos posee ciertas desventajas, entre ellas la posible toxicidad del solvente, inflamabilidad y costo del mismo y el tiempo adicional asociado con el proceso de purificación posterior (Jennings y Akoh, 1999).

Con respecto al efecto del mismo sobre el desarrollo de la reacción, éste puede resultar de gran importancia debido a diversos factores. El aumento que genera en la solubilidad de los sustratos no polares podría favorecer el paso de esterificación por sobre el de hidrólisis (Jennings y Akoh, 1999). Por otro lado, el particionado de los sustratos y productos entre el seno de la fase solvente y la superficie de la enzima puede también afectar las velocidades relativas de hidrólisis y reesterificación (Miller et al., 1991). Por otro lado, se ha demostrado que el solvente afecta la especificidad de sustrato por parte de las lipasas (Sellappan y Akoh, 2002); un cierto compuesto puede encontrarse fuertemente favorecido en ciertos solventes, mientras que otro puede resultar más reactivo en un solvente diferente (Janssen et al., 1996). Como cualquier otro sustrato, los ácidos grasos difieren en términos de polaridad y solubilidad, características dadas principalmente por el largo y nivel de saturación de sus cadenas carbonadas (Sellappan y Akoh, 2002). Por otro lado, los solventes pueden actuar sobre la estructura de las lipasas, generando conformaciones específicas, modificando la energía de activación de los diferentes pasos de la reacción global. Por último, la presencia de solvente en el medio podría influir sobre la acil migración, reacción química consistente en el desplazamiento espontáneo de un residuo acilo de la posición *sn*-2 a la *sn*-1(3) de los glicéridos parciales (monoglicéridos (MAG) y diglicéridos (DAG)) con el objetivo de alcanzar una conformación termodinámicamente más estable (Serdarevich, 1967). Esta reacción ocurre en forma paralela a la reacción enzimática, afectando indirectamente el desarrollo de esta última.

## 4.2. CONDICIONES DE REACCIÓN

Las experiencias llevadas a cabo para el estudio de la cinética de la reacción se realizaron de acuerdo al método descrito en la Sección 2.2.10. La totalidad de los ensayos se realizó a una velocidad de agitación de 230 rpm, valor que se demostró permite lograr una buena homogeneización de la muestra, mientras que minimiza la atrición del soporte del biocatalizador. Por otro lado, el contenido de agua de los



diferentes sistemas quedó determinado por las contribuciones individuales realizadas por los sustratos y las enzimas, cuyas concentraciones variaron de un sistema a otro.

La temperatura de reacción se fijó en 70°C para asegurar que la totalidad de las especies en solución se encuentren en estado líquido, ya que el punto de fusión del aceite totalmente hidrogenado (FHSO) utilizado en las experiencias analizadas en el presente capítulo fue de 70°C. Por otra parte, los resultados obtenidos en el capítulo precedente indicaron que un cambio de temperatura en el rango de 65 a 75°C no generó cambios significativos en el desarrollo de la reacción.

Se ensayaron las dos enzimas estudiadas anteriormente, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM. Se llevaron a cabo experiencias con dos concentraciones de enzima (5 y 10%, m/m<sub>sust.</sub>) con el objetivo de evaluar el efecto de un cambio en la cantidad de catalizador sobre la cinética de la reacción.

Las relaciones de sustratos (SO:FHSO, % m/m) se establecieron en el rango de 50:50 a 80:20, valores mayormente utilizados en la literatura y alrededor de la proporción que resultó satisfactoria en el capítulo anterior (70:30). En la Tabla 4.1. se resumen las condiciones de los ensayos realizados.

Se evaluó la evolución de la reacción en un período de tiempo de 48 h, tomando datos a diferentes tiempos intermedios, siendo los intervalos de muestreo más pequeños durante las primeras horas de reacción, en las cuales se producen los mayores cambios de composición en los sistemas.

**Tabla 4.1.** Condiciones de reacción para los ensayos de cinética de interesterificación.

	Lipozyme RM IM				Lipozyme TL IM		
<b>Temperatura (°C)</b>	70	70	70	70	70	70	70
<b>Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>)</b>	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
<b>SO:FHSO (% m/m)</b>	50:50	60:40	70:30	80:20	50:50	65:35	80:20

Velocidad de agitación: 230 rpm.

Por otra parte, se estudió el efecto del agregado de hexano al medio de reacción para aquellas reacciones catalizadas por Lipozyme RM IM. En la Tabla 4.2. se

resumen las condiciones de los ensayos realizados en sistemas con solvente. En estos sistemas, los cuales no fueron estudiados mediante el diseño de experimentos del precedente capítulo, se realizó un estudio del efecto de la temperatura, llevando a cabo ensayos a 55°C y 60°C. La elección de la menor temperatura se fundamentó en el hecho de que a partir de 55°C las mezclas reactivas analizadas con mayor proporción de FHSO (50:50) se encontraban completamente solubilizadas en el solvente mencionado, reduciendo las limitaciones de transferencia de masa que pudieran presentarse. El límite superior del rango de temperatura elegido se fijó considerando un margen aceptable por debajo del punto de ebullición del hexano (69°C). El rango de relación de sustratos se acotó, llevándose a cabo reacciones con una proporción SO:FHSO de 50:50 y 60:40. Como se mencionara previamente, uno de los objetivos de la incorporación de un solvente a este tipo de sistemas es favorecer la solubilidad y movilidad de las especies en solución. Por lo tanto, su efecto se evaluó sobre muestras con contenido apreciable de ácidos grasos saturados.

**Tabla 4.2.** Condiciones de reacción para los ensayos de cinética de interesterificación en presencia de hexano.

Lipozyme RM IM						
<b>Temperatura (°C)</b>	60			55		
<b>Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>)</b>	5	10		5		
<b>SO:FHSO (% m/m)</b>	50:50	60:40	50:50	60:40	50:50	60:40

Velocidad de agitación: 230 rpm.

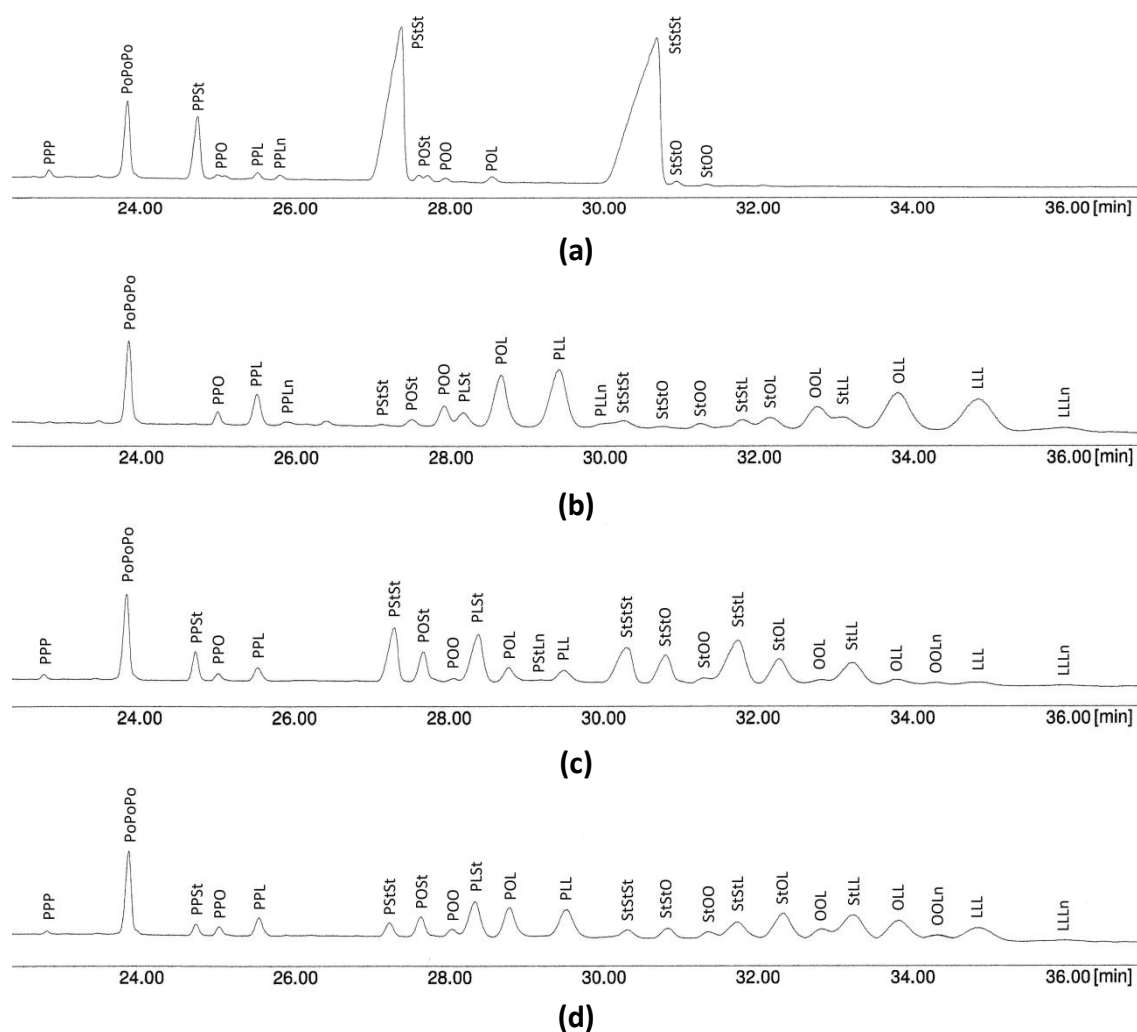
## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. ANÁLISIS GENERAL DE LOS PRODUCTOS

#### 4.3.1.1. COMPOSICIÓN EN TAG DE LOS PRODUCTOS EN EL EQUILIBRIO

En la Figura 4.1. se muestran cromatogramas característicos correspondientes a la zona de triglicéridos (TAG) de ambos sustratos y de dos productos de interesterificación con las dos relaciones de sustratos extremas consideradas (50:50 y

80:20) obtenidas a 48 h de reacción. Se puede observar que la proporción de los TAG en general se modificó sustancialmente como consecuencia del reordenamiento de los ácidos grasos generado por la reacción. En los productos obtenidos se observa un incremento de la concentración de algunas especies que son minoritarias en los sustratos o que, como el caso del PStLn, no habían sido detectadas inicialmente.



**Figura 4.1.** Cromatogramas de la zona de triglicéridos (TAG) para ambos sustratos (a) aceite de soja totalmente hidrogenado (FHSO), (b) aceite de soja refinado (SO) y dos productos de interesterificación con relaciones de sustratos (SO:FHSO, % m/m) de (c) 50:50 y (d) 80:20.

Los TAG mayoritarios en ambos sustratos y en sus mezclas son PStSt, PLL, StStSt, OLL y LLL. Como era esperable, éstos resultaron ser los constituidos por los ácidos grasos mayoritarios en el SO (12%, 20% y 53% (mol/mol) de ácidos palmítico,

oleico y linoleico, respectivamente) y en el FHSO (13% y 83% (mol/mol) de ácidos palmítico y esteárico, respectivamente).

En la Tabla 4.3. se presentan los porcentajes molares a las 48 h de reacción de las especies mayoritarias de los sustratos, incluyendo además los TAG que, luego del proceso de reacomodamiento, resultaron elevar sus concentraciones significativamente. Éstas se detallan para las diferentes relaciones de sustratos utilizadas, para ambas enzimas (con una concentración de 5%) y para las mezclas de reacción antes y después del proceso de interesterificación.

**Tabla 4.3.** Concentraciones molares (mM) de los TAG mayoritarios en las mezclas de reacción antes y después de la reacción de interesterificación (48 h).

TAG <sup>A</sup>	Concentraciones molares (mM)											
	50:50 <sup>B</sup>			60:40		65:35		70:30		80:20		
	Mezcla	RM IM	TL IM	Mezcla	RM IM	Mezcla	TL IM	Mezcla	RM IM	Mezcla	RM IM	TL IM
<b>PStSt</b>	<b>147.50</b>	<b>72.14</b>	<b>77.15</b>	<b>118.15</b>	<b>53.70</b>	<b>103.48</b>	<b>41.51</b>	<b>88.81</b>	<b>25.18</b>	<b>59.46</b>	<b>16.24</b>	<b>18.56</b>
PLSt	11.227	82.87	78.98	13.47	87.19	14.60	85.80	15.72	69.38	17.96	63.29	62.52
<b>PLL</b>	<b>74.90</b>	<b>4.81</b>	<b>5.34</b>	<b>89.88</b>	<b>40.04</b>	<b>97.37</b>	<b>48.37</b>	<b>104.86</b>	<b>44.89</b>	<b>119.84</b>	<b>67.84</b>	<b>66.33</b>
<b>StStSt</b>	<b>301.15</b>	<b>92.96</b>	<b>80.94</b>	<b>244.48</b>	<b>61.16</b>	<b>216.15</b>	<b>39.59</b>	<b>187.81</b>	<b>26.86</b>	<b>131.14</b>	<b>21.97</b>	<b>22.57</b>
StStL	11.47	144.85	136.60	13.77	127.43	14.91	108.99	16.06	84.57	18.35	58.89	56.21
StOL	19.48	74.16	81.98	23.38	88.88	25.33	98.11	27.27	93.82	31.17	92.21	88.14
StLL	23.31	91.15	96.98	27.97	112.46	30.30	125.33	32.64	120.20	37.30	119.35	114.14
<b>OLL</b>	<b>91.70</b>	<b>24.77</b>	<b>34.41</b>	<b>110.04</b>	<b>37.78</b>	<b>119.21</b>	<b>59.59</b>	<b>128.38</b>	<b>63.33</b>	<b>146.72</b>	<b>105.41</b>	<b>102.33</b>
<b>LLL</b>	<b>102.64</b>	<b>23.67</b>	<b>36.98</b>	<b>123.17</b>	<b>34.76</b>	<b>133.44</b>	<b>50.51</b>	<b>143.70</b>	<b>58.82</b>	<b>164.23</b>	<b>96.52</b>	<b>94.54</b>

<sup>A</sup>Se destacan en negrita los TAG predominantes en los sustratos.

<sup>B</sup>Relación SO:FHSO (% m/m).

Condiciones de reacción: 5% enzima (m/m<sub>sust.</sub>), 70°C, 230 rpm, ausencia de solvente.

Si se analizan los TAG mayoritarios en los sustratos (PStSt, PLL, StStSt, OLL y LLL) se puede observar claramente una reducción en sus concentraciones para las cinco relaciones de sustratos consideradas y para ambas enzimas, incrementándose en general en los productos de reacción el porcentaje de los triglicéridos mono y diinsaturados (PLSt, StStL, StOL y StLL) en detrimento de las triglicéridos trisaturados y triinsaturados (PStSt, StStSt y LLL).

En la Tabla 4.4. se presentan los cambios porcentuales de concentración molar sufridos por cada una de las especies presentadas en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.4.** Porcentajes de cambio de concentración molar de los TAG mayoritarios.

TAG <sup>A</sup>	Porcentaje de cambio generado por la reacción <sup>B</sup>						
	50:50 <sup>C</sup>		60:40	65:35	70:30	80:20	
	RM IM	TL IM	RM IM	TL IM	RM IM	RM IM	TL IM
<b>PStSt</b>	<b>-51.09</b>	<b>-47.69</b>	<b>-54.55</b>	<b>-59.89</b>	<b>-66.22</b>	<b>-72.69</b>	<b>-68.79</b>
PLSt	638.12	603.46	547.30	487.85	341.33	252.31	248.01
<b>PLL</b>	<b>-93.58</b>	<b>-92.87</b>	<b>-55.45</b>	<b>-50.32</b>	<b>-57.19</b>	<b>-43.39</b>	<b>-44.65</b>
<b>StStSt</b>	<b>-69.13</b>	<b>-73.12</b>	<b>-74.98</b>	<b>-81.68</b>	<b>-82.96</b>	<b>-83.25</b>	<b>-82.79</b>
StStL	1162.72	1090.81	825.40	630.88	426.56	220.84	206.26
StOL	280.66	320.80	280.16	287.36	244.03	195.82	182.76
StLL	291.01	316.03	302.09	313.59	268.25	220.01	206.04
<b>OLL</b>	<b>-72.98</b>	<b>-62.48</b>	<b>-65.66</b>	<b>-50.01</b>	<b>-50.67</b>	<b>-28.15</b>	<b>-30.25</b>
<b>LLL</b>	<b>-76.94</b>	<b>-63.97</b>	<b>-71.78</b>	<b>-62.15</b>	<b>-59.07</b>	<b>-41.23</b>	<b>-42.44</b>

<sup>A</sup>Se destacan en negrita los TAG predominantes en los sustratos.

<sup>B</sup>Calculado como:  $((\%TAG_i)_{prod} - (\%TAG_i)_{mezcla}) / (\%TAG_i)_{mezcla} * 100\%$ .

<sup>C</sup>Relación SO:FHSO (% m/m).

Condiciones de reacción: 5% enzima (m/m<sub>sust.</sub>), 70°C, 230 rpm, ausencia de solvente.

En términos generales, ambas enzimas actuaron de manera similar, observándose mayores diferencias con una relación de sustratos 50:50 que con 80:20. En particular, para el caso de StOL, los cambios producidos por una u otra lipasa, a una relación 50:50 difirieron entre sí ( $P < 0.05$ ).

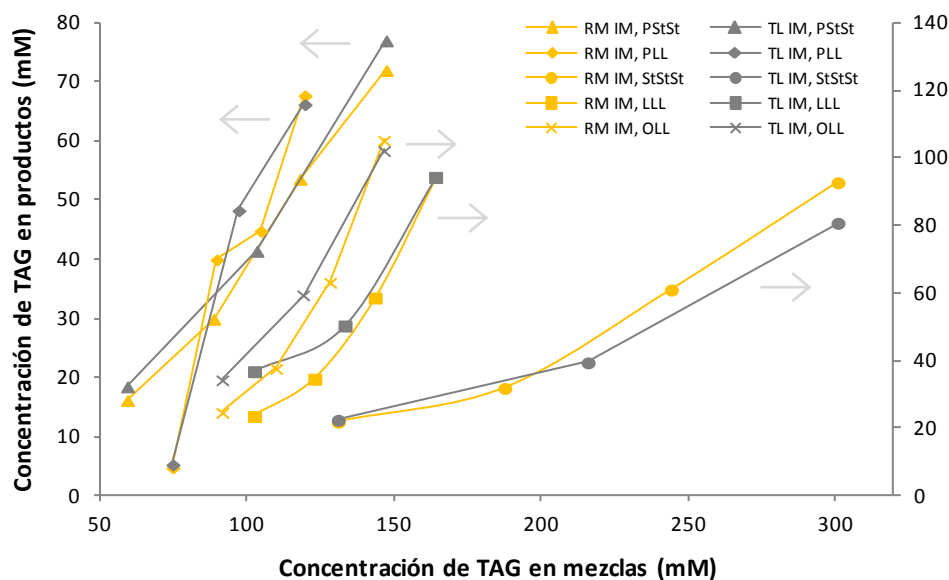
Las especies inicialmente predominantes redujeron su concentración notablemente para la totalidad de las condiciones consideradas. Los porcentajes de reducción para PStSt y StStSt se incrementaron moderadamente con la relación de sustratos (SO:FHSO) modificándose de alrededor de 50 a 70% para el caso de PStSt y de aproximadamente 70 a 83% para el caso de StStSt, cuando la relación de sustratos

se varió entre 50:50 y 80:20. Este último resultado es particularmente interesante debido a la propiedad que posee la triestearina de impartir una sensación “cerosa” en la boca; con lo cual reducciones semejantes por parte de la reacción de interesterificación implicarían una mejora importante en las propiedades organolépticas de los productos obtenidos por medio de la misma respecto a otras tecnologías, como puede ser el “blending”.

Por otra parte, en el caso del PLL y los triglicéridos triinsaturados OLL y LLL su reducción presenta una mayor dependencia y una relación inversa con la relación de sustratos. Estos productos sufrieron sus mayores reducciones para el caso de las mezclas 50:50 y las menores en el de las correspondientes a la relación 80:20. Los porcentajes medios de reducción fueron aproximadamente: 93 - 44%, 67 - 29% y 70 - 41% para LLP, OLL y LLL, respectivamente. Si se analizan los valores reportados se observa que las mayores reducciones en cada tipo de triglicérido las sufrieron aquellas mezclas que inicialmente contenían la menor proporción de los ácidos grasos predominantes en dichos glicéridos.

Cuando las composiciones de la Tabla 4.3. se representan como concentración de cada TAG en los productos finales en función de su contenido en la mezcla de reacción (Figura 4.2.) se puede observar que para los principales reactivos la concentración de equilibrio es directamente proporcional a la concentración inicial. No se aprecian variaciones importantes en las concentraciones de los TAG mayoritarios cuando los productos se obtienen por el accionar de Lipozyme RM IM o TL IM, y en particular estas diferencias no son significativas para la relación 80:20. En general, puede observarse que los productos generados con Lipozyme TL IM poseen una concentración levemente inferior de StStSt y mayor de OLL y LLL que los generados con Lipozyme RM IM. Si se analiza el efecto como grupos (StStSt + PStSt en SSS y OLL + LLL en UUU) para la relación 50:50, los SSS varían en forma similar con ambas enzimas (la diferencia en StStSt es compensada por la diferencia inversa en PStSt); en cambio para los UUU se mantiene el hecho de que con Lipozyme TL IM este grupo aumentó su concentración por encima del valor encontrado con Lipozyme RM IM. Esto podría interpretarse como una diferencia en el comportamiento de ambos biocatalizadores (enzima + soporte) principalmente ante los TAG con ácidos grasos saturados. Una

posible hipótesis podría ser que Lipozyme TL IM tendría cierta preferencia por hidrolizar ácidos grasos saturados (principalmente St) en lugar de insaturados. Existe evidencia que indica que Lipozyme RM IM tendría mayor preferencia por esterificar St por sobre P en reacciones de acidólisis (Carrín y Crapiste, 2008; Palla et al., 2012).



**Figura 4.2.** Efecto de la interesterificación (48 h) sobre la concentración de los TAG mayoritarios en las mezclas iniciales para las diferentes relaciones SO:FHSO. Condiciones de reacción: 5% enzima ( $m/m_{\text{sust.}}$ ), 70°C, 230 rpm.

Las especies que resultaron mayoritarias luego del proceso de interesterificación fueron aquellos triglicéridos mono y diinsaturados que poseían en su composición en ácidos grasos los predominantes en el aceite y la grasa, linoleico y esteárico respectivamente; éstos fueron: PLSt, StStL, StOL y StLL. El aumento en StStL resultó ser extraordinariamente elevado, siendo de aproximadamente 1100% para la relación 50:50, mientras que el menor porcentaje de cambio, de 213%, lo presentaron las mezclas con 80% de aceite. Luego, PLSt sufrió un aumento también considerable para las muestras con igual proporción de ambos sustratos, siendo el mismo de alrededor de 620%. El aumento correspondiente al extremo opuesto de relación de sustratos resultó de aproximadamente 250%. Por último, los cambios generados sobre los triglicéridos StOL y StLL para una relación 50:50 fueron similares y del orden de



300%; mientras que para la relación 80:20 sus porcentajes de cambio resultaron ser de 190 y 213%, respectivamente.

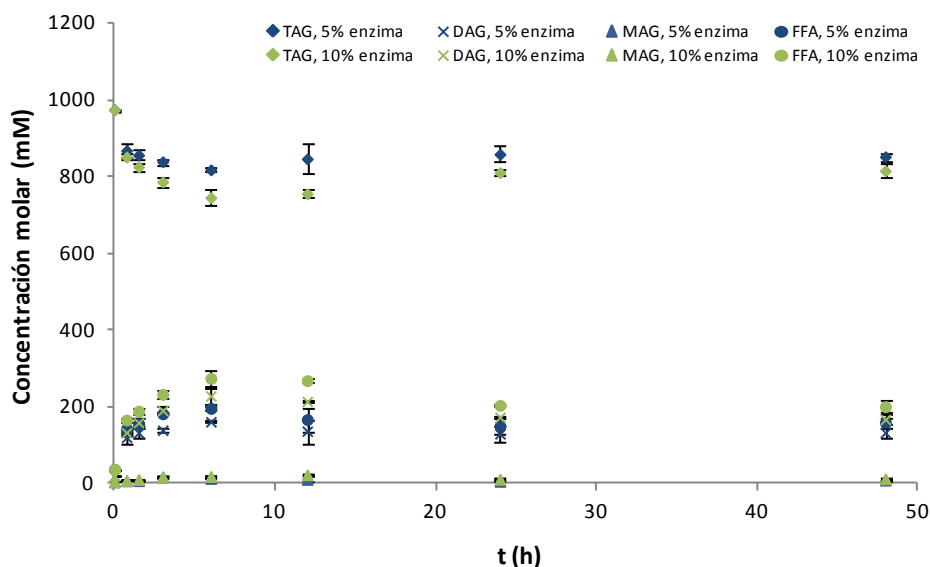
#### 4.3.2. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN

En el presente apartado se analiza la evolución de las diferentes especies involucradas en la reacción a medida que transcurre la misma. Se comienza estudiando los sistemas catalizados por Lipozyme RM IM, para luego continuar con el análisis de los correspondientes a Lipozyme TL IM.

##### 4.3.2.1. LIPOZYME RM IM

###### 4.3.2.1.1. REACCIONES EN AUSENCIA DE HEXANO

En la Figura 4.3. se grafican los perfiles de concentración molar de las especies triglicéridos (TAG), diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG) y ácidos grasos libres (FFA) para las dos concentraciones de enzima utilizadas (5 y 10%) y una relación de sustratos de 50:50 (SO:FHSO). Se presentan los datos para una única relación debido a que, al tratarse de composiciones globales, sin considerar ningún tipo de discriminación por grado de insaturación de los residuos acilo involucrados, éstos resultaron ser comparables.



**Figura 4.3.** Perfiles de concentración en el tiempo para TAG, DAG, MAG y FFA. Condiciones: Lipozyme RM IM, SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 5 y 10%.

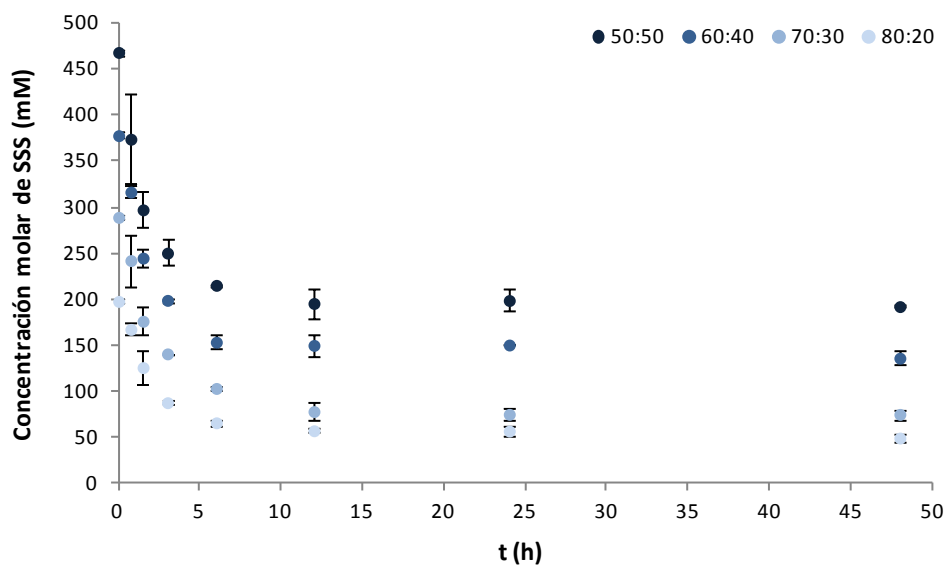
La concentración de TAG disminuye inicialmente acompañando a la generación de productos secundarios, alcanza un mínimo a aproximadamente las 6 h de reacción, y luego aumenta progresivamente para equilibrarse en su valor final; indicando que al principio la velocidad de hidrólisis es mayor que la de reesterificación. En el caso de los DAG, éstos aumentan inicialmente hasta que alcanzan un máximo en su concentración, disminuyendo luego para mantenerse constante a partir de aproximadamente las 24 h de reacción. El mayor cambio en la concentración de DAG se da al principio de la reacción, lográndose en general elevar su concentración en un 70% (respecto al incremento máximo) en los primeros 45 min. Puede observarse que la concentración de MAG resulta despreciable frente a la de las restantes especies, y presenta un comportamiento similar al propio de los DAG.

Los cambios en las concentraciones de FFA, expresados en base molar, resultan proporcionales a los sufridos por los glicéridos parciales. La relación entre ellos viene dada por la estequiometría de la reacción: por cada mol de DAG que se forma se libera uno de ácido graso, mientras que la relación con los MAG es un mol de éstos a dos de ácidos grasos liberados. El mínimo aporte a los FFA que pudiera realizar la hidrólisis hacia MAG, sumado a la contribución inicial de FFA por parte de los sustratos (la cual

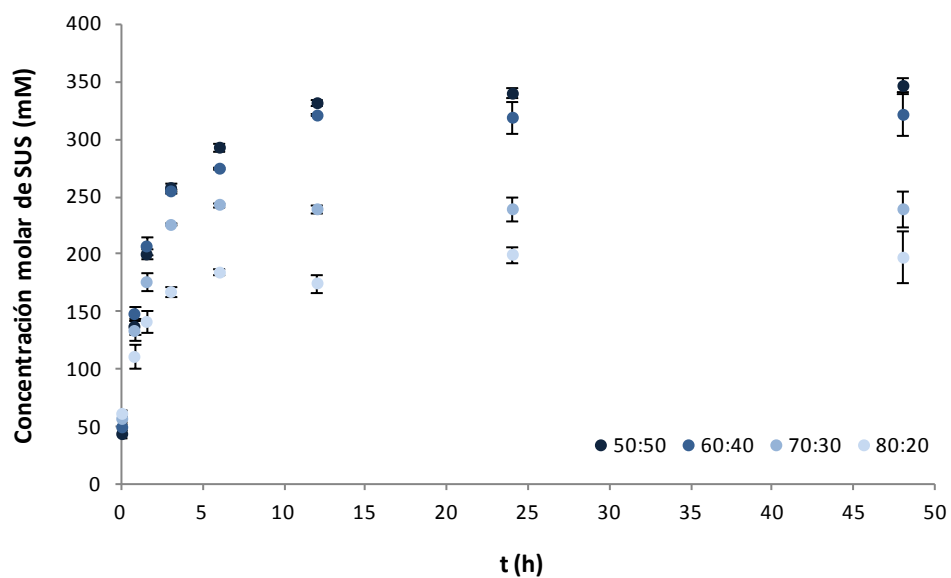
resultó ser mayor que la correspondiente a DAG) generaron perfiles de FFA que se ubicaron siempre por encima de los de DAG, pero proporcionales en magnitud a las concentraciones de MAG y DAG. Por este motivo, de aquí en adelante, y para facilitar la comparación visual de los perfiles obtenidos en diferentes condiciones, no se mostrarán los datos correspondientes a los FFA.

En cuanto al comportamiento del sistema al aumentar la concentración de enzima, se observa que el contenido de productos secundarios es mayor en todo el rango de tiempo considerado, lo cual se explica en términos de que inicialmente la velocidad de hidrólisis es relativamente mayor ya que se duplica el número de sitios activos para la reacción. Seguramente debido al aumento en el contenido de humedad aportado por la enzima se alcanzaron valores de equilibrio diferentes ( $P < 0.05$ ). El aumento de la concentración de subproductos al incrementar la concentración de enzima durante la interesterificación enzimática de estearina de palma y aceite de coco con Lipozyme TL IM a 60°C fue reportado por Zhang et al. (2001), quienes encontraron además que dicho aumento resultó corresponderse linealmente con la cantidad de enzima agregada al medio. No se han encontrado estudios similares con la utilización de Lipozyme RM IM.

En las Figuras 4.4. (a) a (d) se muestran los perfiles de concentración, para una carga de enzima de 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ), de los cuatro grupos de TAG caracterizados por el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de sus moléculas (SSS, SUS, UUS y UUU).

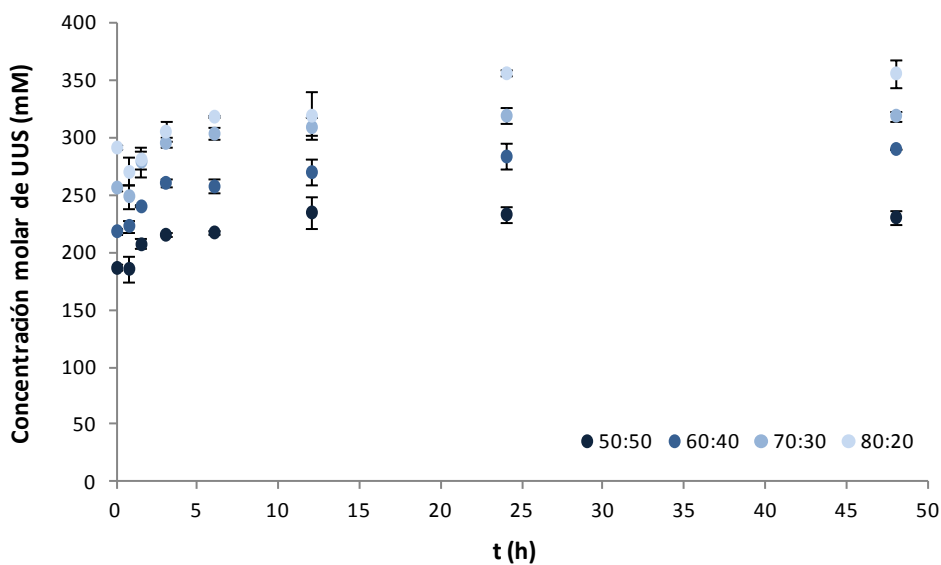


(a)

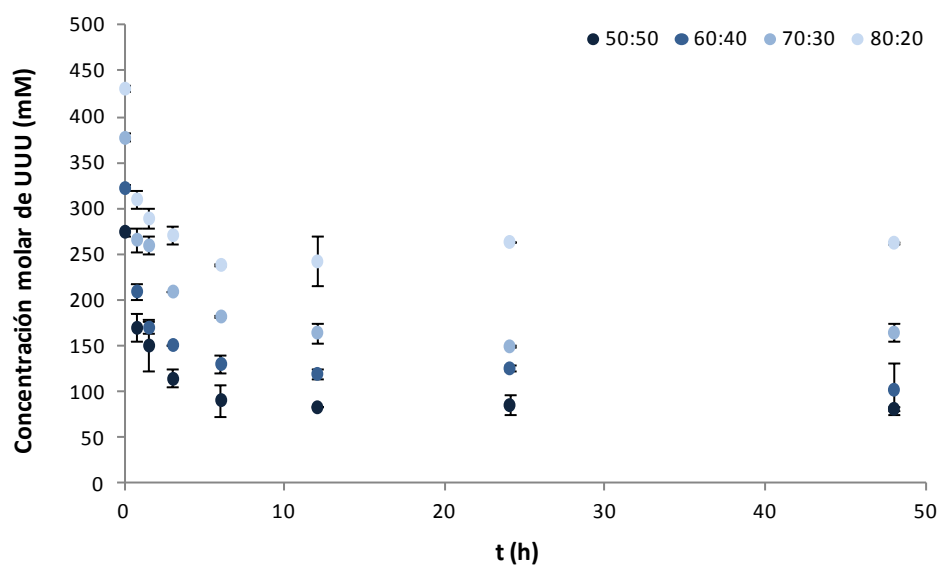


(b)

**Figura 4.4.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.



(c)



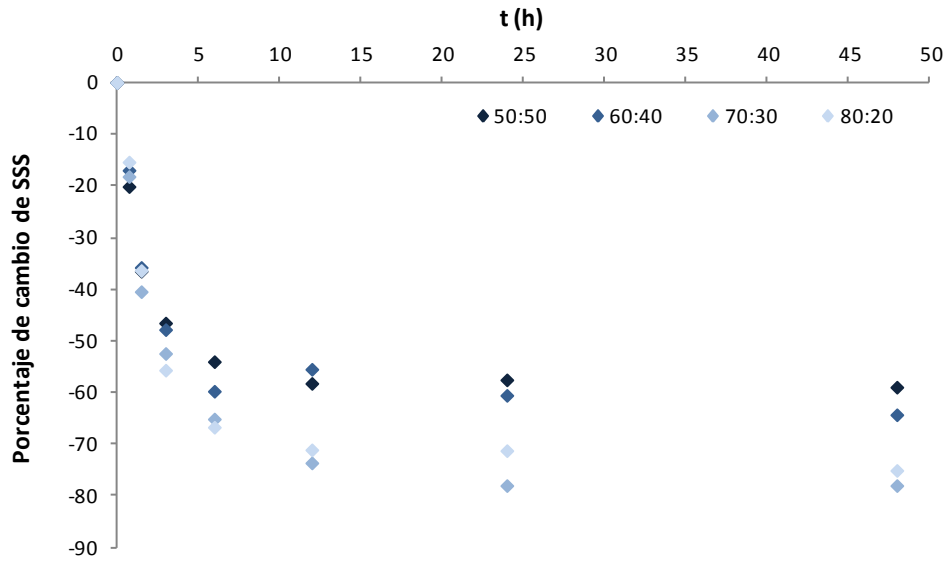
(d)

**Figura 4.4. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.

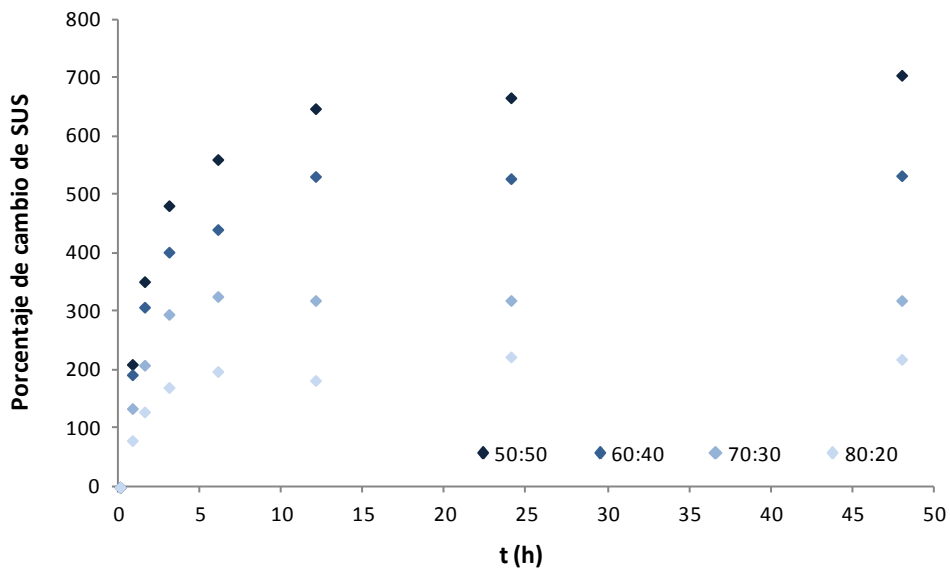
Puede observarse que, para cada serie, la evolución de los TAG sigue el mismo comportamiento general, independientemente de la relación de sustratos. Lógicamente las ubicaciones relativas de las curvas están asociadas a la concentración inicial de cada tipo de TAG en las mezclas de reacción. La concentración de TAG trisaturados (SSS) y triinsaturados (UUU) decrece a lo largo del tiempo hasta alcanzar

el equilibrio, excepto probablemente a altas concentraciones de UUU (relación 80:20) donde parece observarse un mínimo coincidente con el de los TAG totales (Figura 4.3.), indicando que para estos compuestos en la mayoría de los casos es siempre mayor la velocidad neta de desaparición por hidrólisis que la generación por reesterificación. En cambio, la concentración de TAG con dos ácidos grasos insaturados (UUS) crece a medida que avanza la esterificación, excepto en los tiempos iniciales donde predomina la reacción de hidrólisis. Finalmente, la concentración de TAG con dos ácidos grasos saturados (SUS) aumenta continuamente con el tiempo de reacción.

Para visualizar el efecto de la relación de sustratos sobre la cinética, los datos de la Figura 4.4. fueron normalizados con la respectiva concentración inicial, con excepción de los correspondientes a UUS que presentaron escasa variación (Figura 4.5.). Puede apreciarse que con el incremento de la relación SO:FHSO existe una tendencia a generar mayor cambio en la concentración de SSS (Figura 4.5. (a)), inversamente a lo que ocurre con UUU (Figura 4.5. (b)), aunque para este grupo de TAG la variación es mayor. En cambio, en la Figura 4.4. (b) se observa que las variaciones en la concentración de SUS son muy dependientes de la relación inicial SO:FHSO (Figura 4.5. (c)), obteniéndose los mayores cambios cuando se partió de mezclas con mayor contenido de FHSO. Por otra parte, los cambios en la concentración de UUS fueron los menos apreciables, observándose algún consumo neto en los tiempos iniciales (siendo el valor más bajo encontrado de -7.3% para la relación 80:20) y aumentando como máximo hasta 32.4% para la relación 60:40.

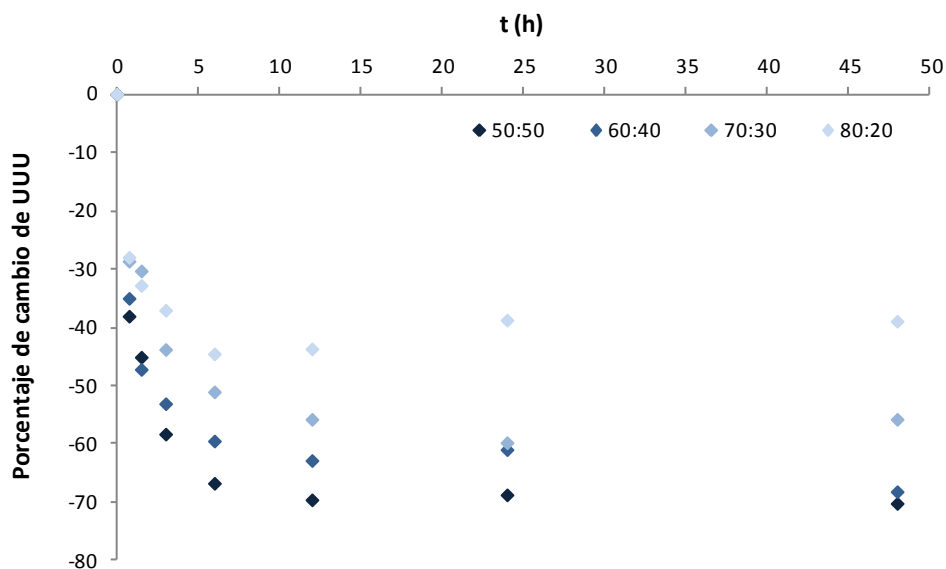


(a)



(b)

**Figura 4.5.** Porcentajes de cambio de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS y (c) UUU. Condiciones de reacción: 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.

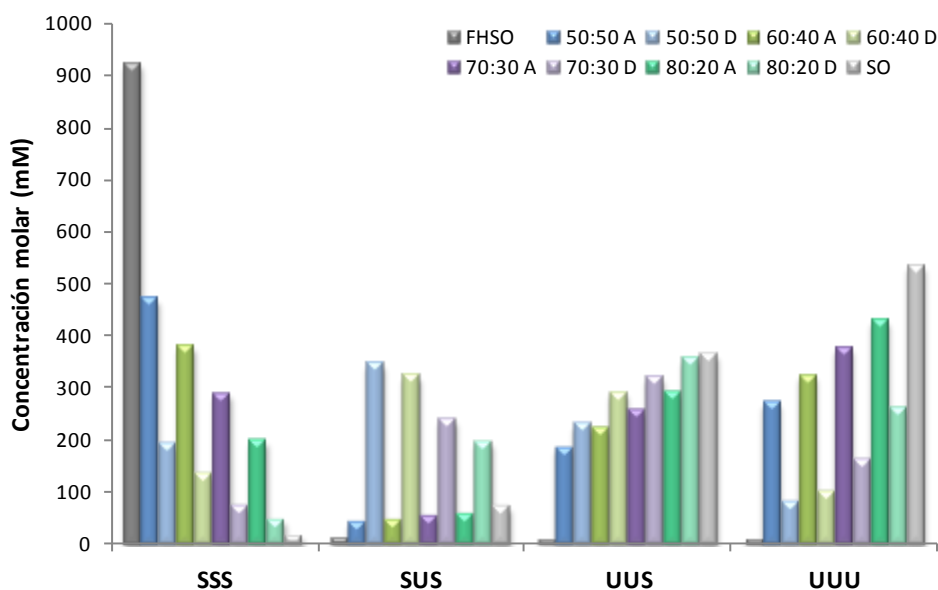


(c)

**Figura 4.5.** (cont.) Porcentajes de cambio de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS y (c) UUU. Condiciones de reacción: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.

Con el objetivo de visualizar mejor y comparar la magnitud de los cambios producidos por la reacción sobre cada grupo de TAG en el equilibrio, en la Figura 4.6. se representan las concentraciones molares de cada uno de dichos grupos para las mezclas reactivas iniciales y para los productos de interesterificación a 48 h, considerando las cuatro relaciones SO:FHSO. Asimismo, a modo comparativo se muestran también las correspondientes concentraciones de los sustratos originales.



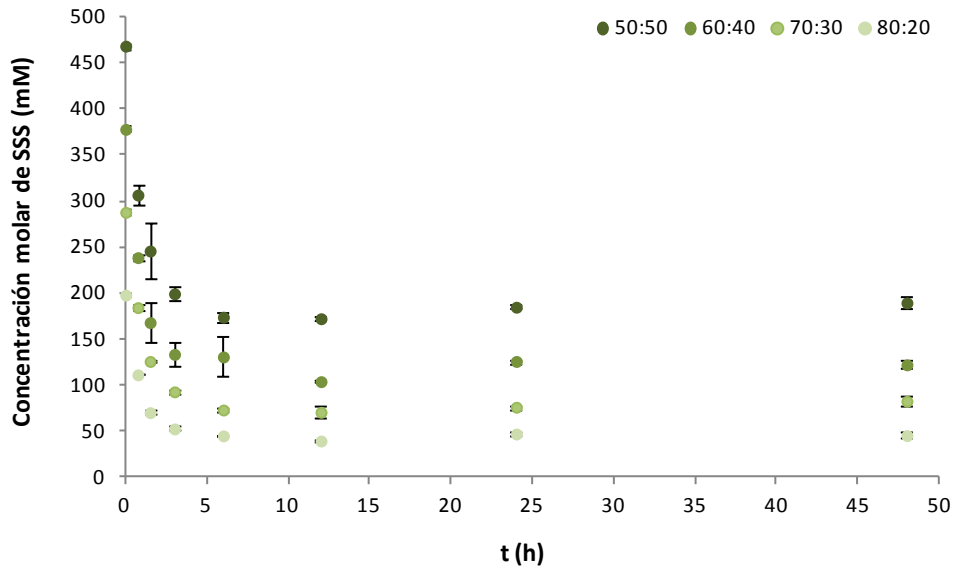


**Figura 4.6.** Concentraciones molares (mM) de los diferentes grupos de TAG para ambos sustratos y para las distintas relaciones SO:FHSO (% m/m), antes (A) y después (D) del proceso de interesterificación (48 h). Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.

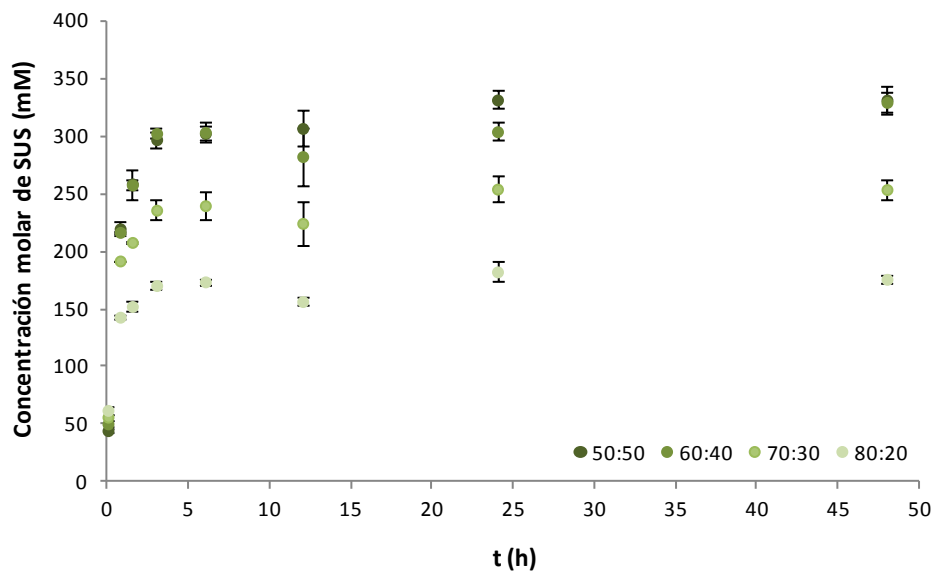
Es posible notar que el grupo de TAG que sufrió mayores cambios, aumentando su concentración, fue el de los TAG disaturados (SUS), mientras que el de los diinsaturados (UUS) resultó ser el que mantuvo en mayor medida su concentración, aunque la misma aumentó levemente. El importante incremento determinado en la concentración de los SUS, que se encuentra en el rango 706 - 210 %, puede explicarse observando sus concentraciones iniciales en las diferentes mezclas reactivas: su proporción era mínima respecto a los tres grupos restantes, resultando ser los TAG más alejados de sus valores de equilibrio. Por el contrario, los UUS no debieron modificarse sustancialmente para alcanzar sus concentraciones de equilibrio en los productos finales, sufriendo incrementos del orden del 25%.

En cuanto a los dos grupos restantes, SSS y UUU, la tendencia es similar: una disminución en su concentración molar porcentual, la cual aumenta moderadamente a medida que se reduce su contenido inicial en la mezcla de reacción. Esta reducción en la concentración fue del orden del 60 - 80% y de 70 - 40% para SSS y UUU, respectivamente, cuando se incrementó la relación de sustratos.

Para las reacciones llevadas a cabo con una concentración de enzima del 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ), se obtuvieron los perfiles presentados en la Figura 4.7.

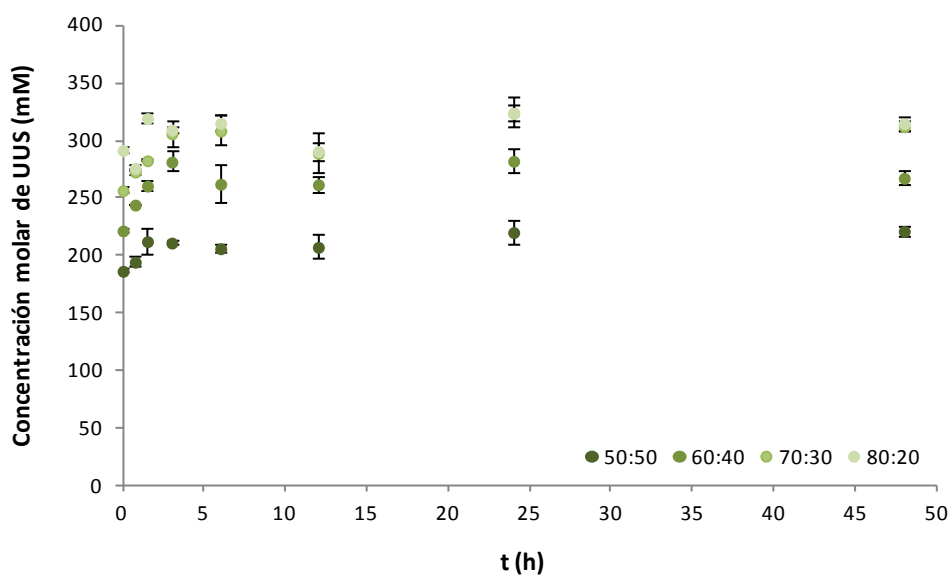


(a)

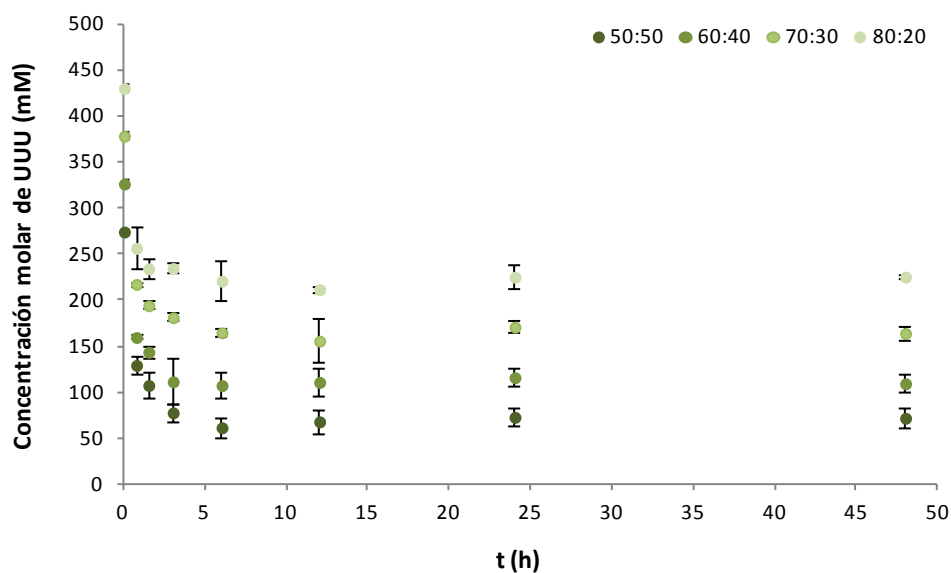


(b)

**Figura 4.7.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.



(c)

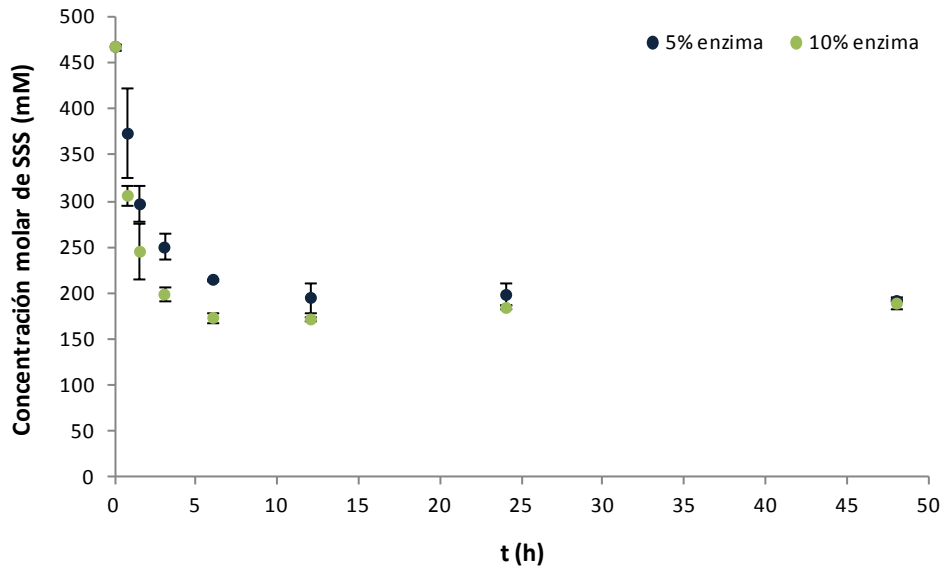


(d)

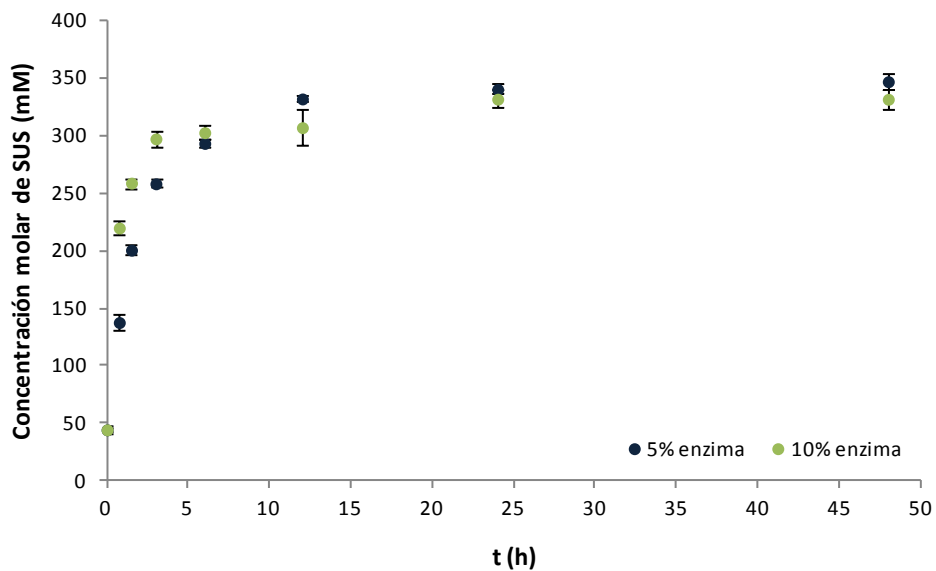
**Figura 4.7. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 10% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.

Mediante una simple inspección de los perfiles obtenidos, y comparándolos con los correspondientes a un 5% de lipasa (Figura 4.4.), se observan tendencias similares en los mismos; aunque a mayor concentración de enzimas se magnifica la aparición de mínimos y máximos relativos en la concentración de las distintas series de TAG. A fin de permitir una mejor visualización del efecto de la concentración de enzima, en la

Figura 4.8. se comparan las curvas obtenidas para ambas concentraciones y una relación de sustratos 50:50 (% m/m). Debe destacarse que se observaron tendencias similares en el desarrollo de las reacciones llevadas a cabo a partir de las restantes mezclas de reacción.

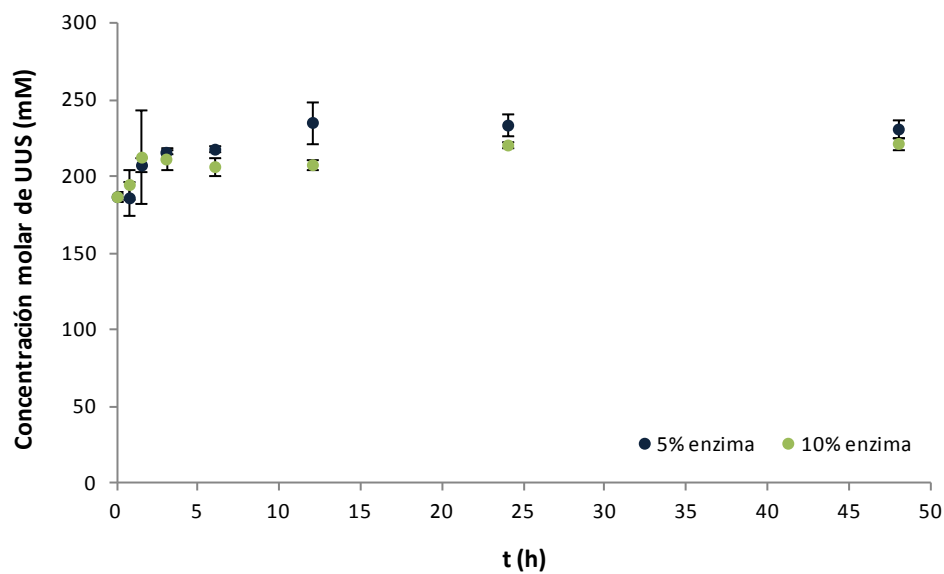


(a)

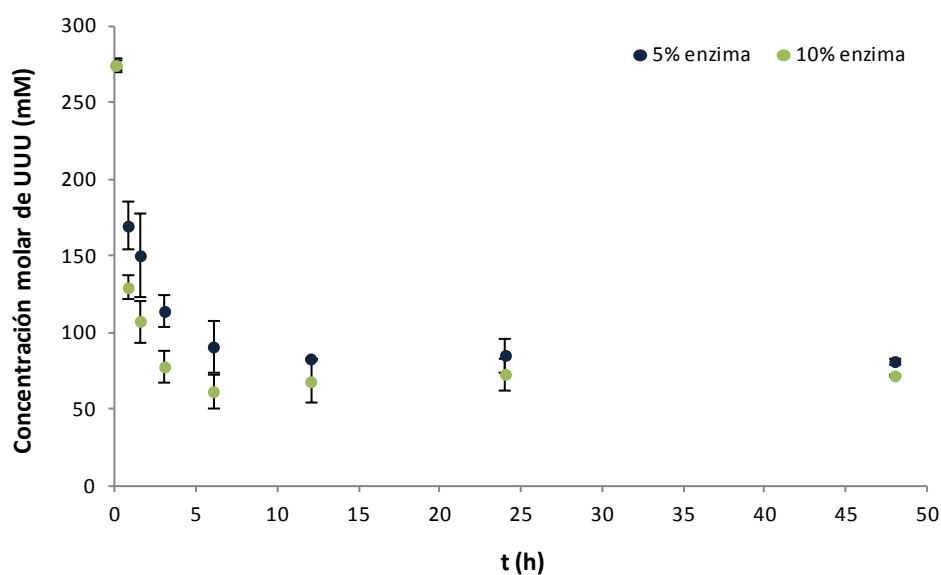


(b)

**Figura 4.8.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme RM IM, SO:FHSO (% m/m): 50:50, 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>SUST.</sub>): 5% y 10%.



(c)



(d)

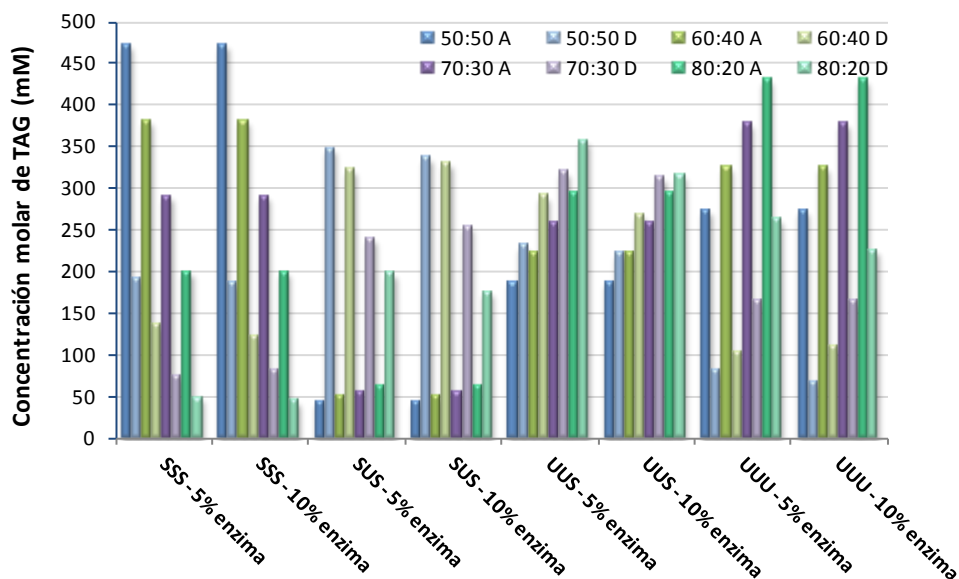
**Figura 4.8. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme RM IM, SO:FHSO (% m/m): 50:50, 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 5% y 10%.

En general se pueden observar marcadas diferencias en las concentraciones para las primeras horas de reacción, siendo más importantes los cambios generados en los sistemas con mayor carga de enzima. En otras palabras, las velocidades iniciales de reacción para estos sistemas fueron mayores, especialmente la hidrólisis de los TAG,

resultado lógico considerando que se duplicó el número de sitios activos catalizadores de la reacción, notándose más claramente la aparición de un mínimo relativo en la concentración de SSS y UUU. Respecto a las series SUS y UUS se observa que la concentración de enzima incrementa inicialmente la velocidad relativa de reesterificación, aunque luego las curvas de concentración se cruzan ya que la cantidad de enzima parece afectar en forma inversa al valor de equilibrio.

En cuanto a los valores de equilibrio alcanzados para ambas condiciones, puede observarse (Figura 4.8.) que aparentemente éstos disminuyen levemente con la concentración de enzima para todas las series de TAG; aunque el análisis estadístico de los resultados a 48 h de reacción indican que estos difirieron significativamente únicamente para los TAG triinsaturados ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la diferencia encontrada en los UUU, sumada a las pequeñas contribuciones que realizaron los tres grupos de TAG restantes cuando se utilizó un 5% de enzima versus un 10%, generaron diferencias significativas en la composición total de TAG (Figura 4.8.).

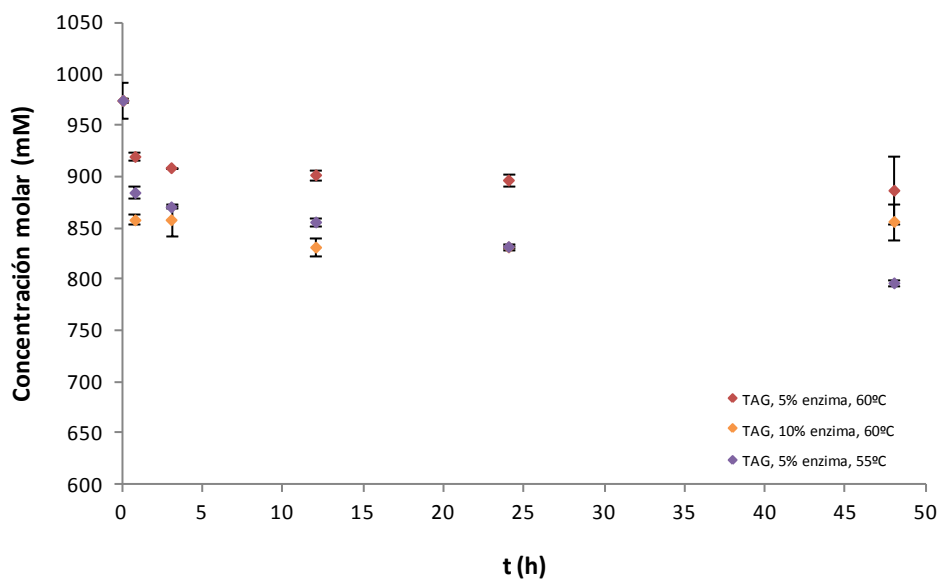
En la Figura 4.9. se presentan nuevamente los valores de concentración final para distintas relaciones de sustratos mostrados en la Figura 4.6., ahora comparándose con los obtenidos para una carga de enzima del 10%. Puede observarse que los valores alcanzados para tres de las cuatro relaciones de sustratos consideradas y con ambas concentraciones de enzima resultan comparables. La excepción se presentó con la relación 80:20, para la cual se encontró que la variación en las concentraciones de UUS y UUU (disminución con mayor porcentaje de enzima) fue significativa.



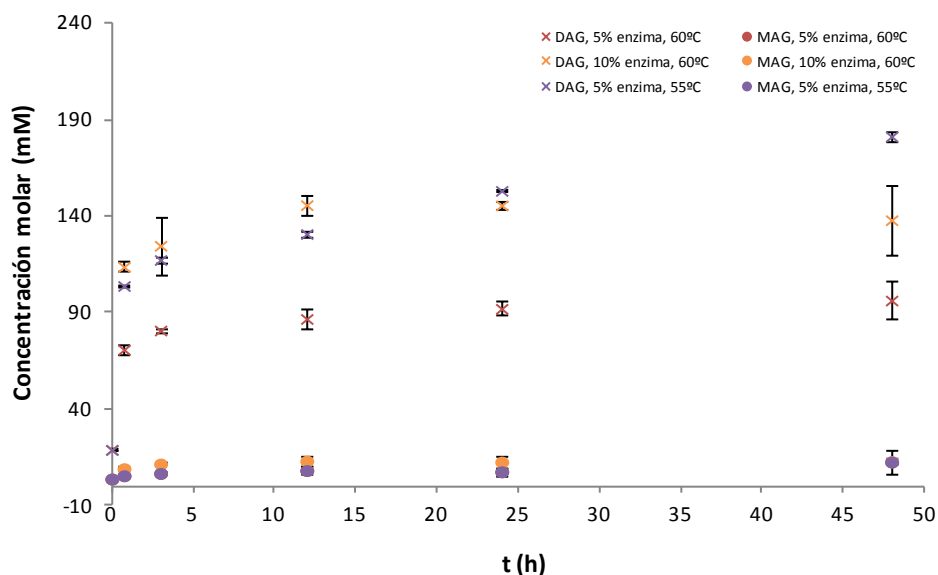
**Figura 4.9.** Concentraciones molares (mM) de los diferentes grupos de TAG para ambos sustratos y para las distintas relaciones SO:FHSO (% m/m), antes (A) y después (D) del proceso de interesterificación (48 h).  
Condiciones: Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm.  
Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 5% y 10%.

#### 4.3.2.1.2. REACCIONES EN PRESENCIA DE HEXANO

En la Figura 4.10. se grafican los perfiles correspondientes a las concentraciones molares totales de los glicéridos involucrados (TAG, DAG, MAG) obtenidos para el caso de las reacciones desarrolladas en presencia de solvente. Se comparan los resultados para las dos concentraciones de enzima consideradas (a 60°C) y para las dos temperaturas utilizadas, a igual concentración de enzima (5%). Nuevamente, al igual que en el caso de las reacciones llevadas a cabo en ausencia de solvente, se presentan los datos obtenidos para una única relación de sustratos (50:50, % m/m).



(a)



(b)

**Figura 4.10.** Perfiles de concentración en el tiempo para (a) TAG, (b) DAG y MAG en presencia de hexano. Condiciones: Lipozyme RM IM, SO:FHSO (% m/m): 50:50, 3 mL<sub>hexano</sub>/g<sub>sust.</sub>, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 5 y 10%. Concentraciones en base libre de hexano.

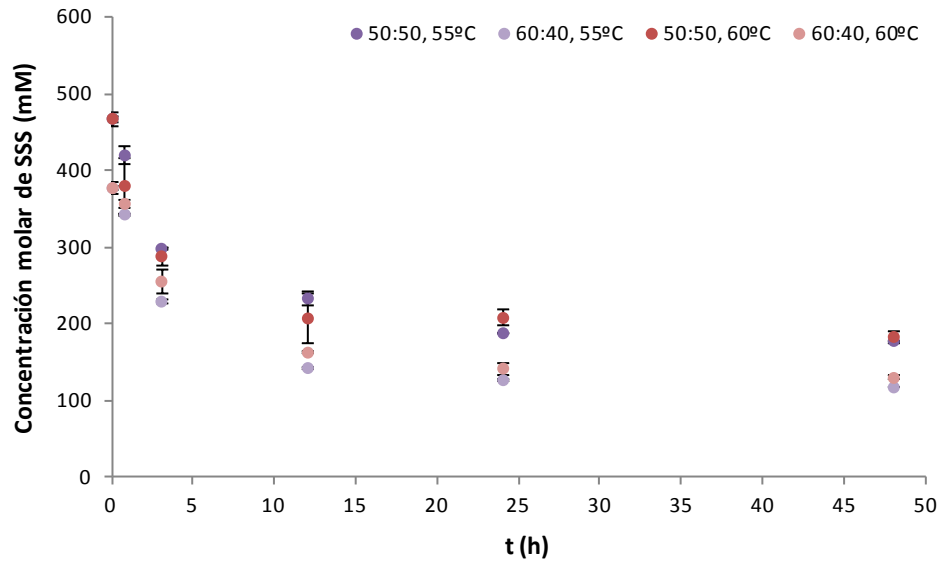
Comparando los perfiles obtenidos para ambas concentraciones de enzima, éstos difirieron significativamente durante al menos las primeras 24 h de reacción, siendo la velocidad neta inicial de reacción mayor para los sistemas que contenían mayor concentración de biocatalizador. Sin embargo, a las 48 h, las concentraciones de



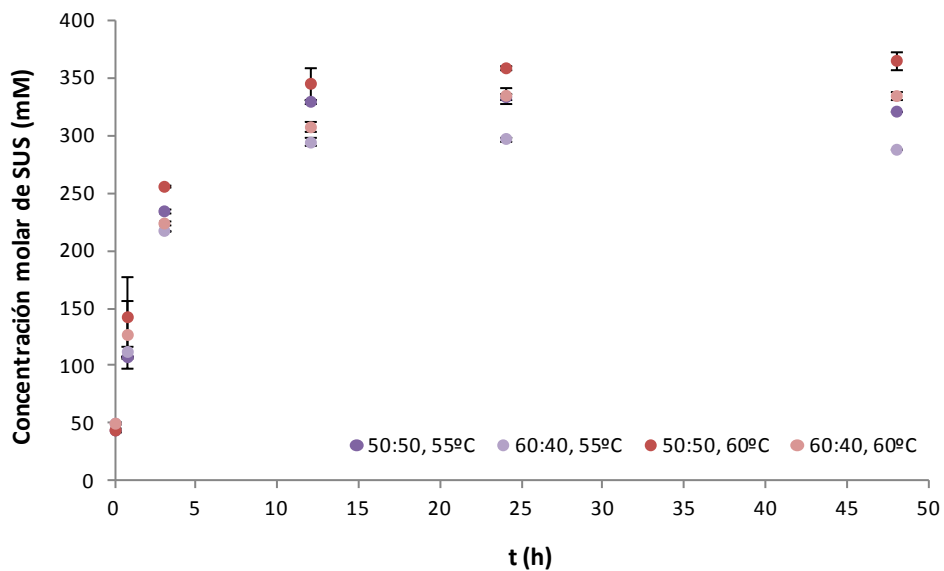
las tres especies resultaron ser comparables ( $P > 0.05$ ). Por lo tanto, se puede concluir que, en presencia de hexano y en las condiciones de reacción estudiadas, el aumento de la concentración de enzima en el rango considerado no modificaría las concentraciones de equilibrio. Este resultado difiere del obtenido con Lipozyme RM IM en ausencia de solvente. Esta diferencia podría atribuirse a la diferencia de temperatura entre ambos sistemas, a la presencia de hexano en el medio de reacción o a un efecto conjunto de ambos factores.

Realizando una comparación con respecto a la temperatura, el aumento de la misma de 55 a 60°C tuvo un efecto considerable sobre la cinética de la reacción; a diferencia de los sistemas libres de solvente, en los cuales se trabajó en un rango de 65 a 75°C (Capítulo 3). Una posible explicación podría residir en el rango de temperatura óptimo de la lipasa. Si en ausencia de solvente su temperatura óptima se encuentra comprendida en el rango analizado (65 - 75°C), resulta lógico que no se hayan apreciado cambios importantes en ese caso. En cambio, en el caso con solvente, si las reacciones se llevaron a cabo fuera del rango óptimo de temperatura para la interesterificación, resultaría esperable encontrar diferencias en su desempeño. A 55°C se generan mayores concentraciones de productos secundarios, por lo que la relación entre la reacción de hidrólisis y la de esterificación se vería más favorecida que en los sistemas a 60°C. Para este último, a las 12 h de reacción ya se habría alcanzado el equilibrio, mientras que a 55°C parecería que incluso a las 48 h de reacción las concentraciones no se encuentran estabilizadas.

En la Figura 4.11. se presenta la evolución de las concentraciones de los diferentes grupos de TAG (SSS, SUS, UUS y UUU) en el tiempo para las dos relaciones de sustratos (50:50 y 60:40) y las dos temperaturas (55 y 60°C) utilizadas.

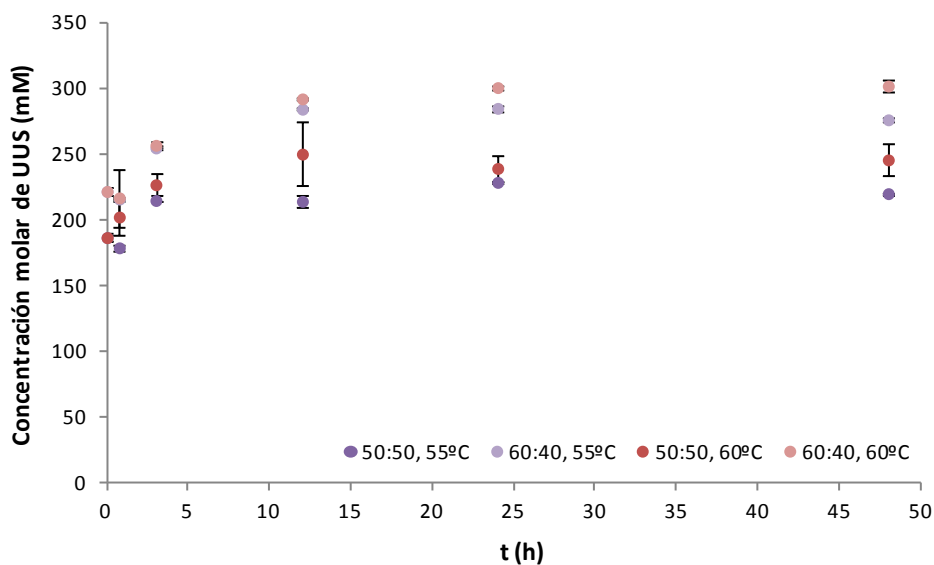


(a)

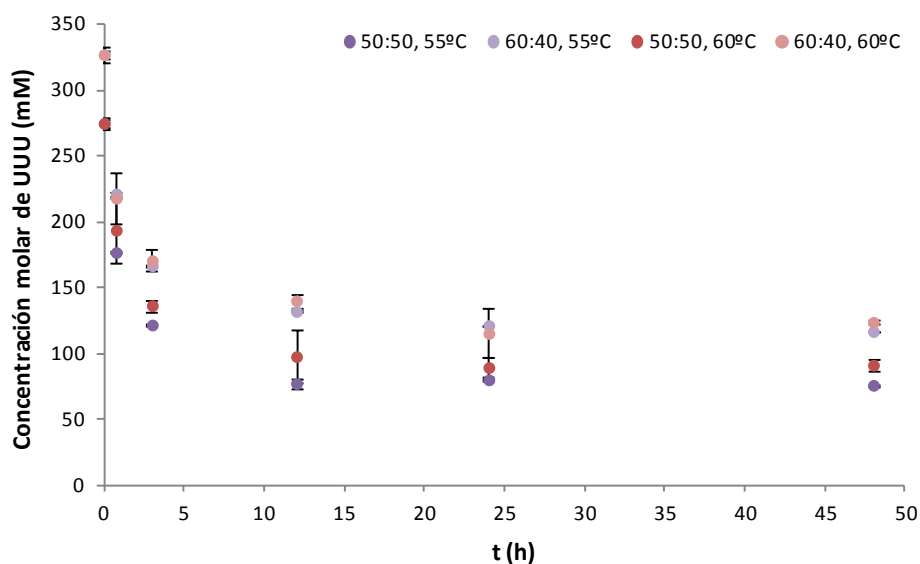


(b)

**Figura 4.11.** Perfiles de concentración en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU en presencia de hexano. Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 3 mL<sub>hexano</sub>/g<sub>sust.</sub>, 230 rpm. SO:FHSO (% m/m): 50:50 y 60:40. Concentraciones en base libre de solvente.



(c)



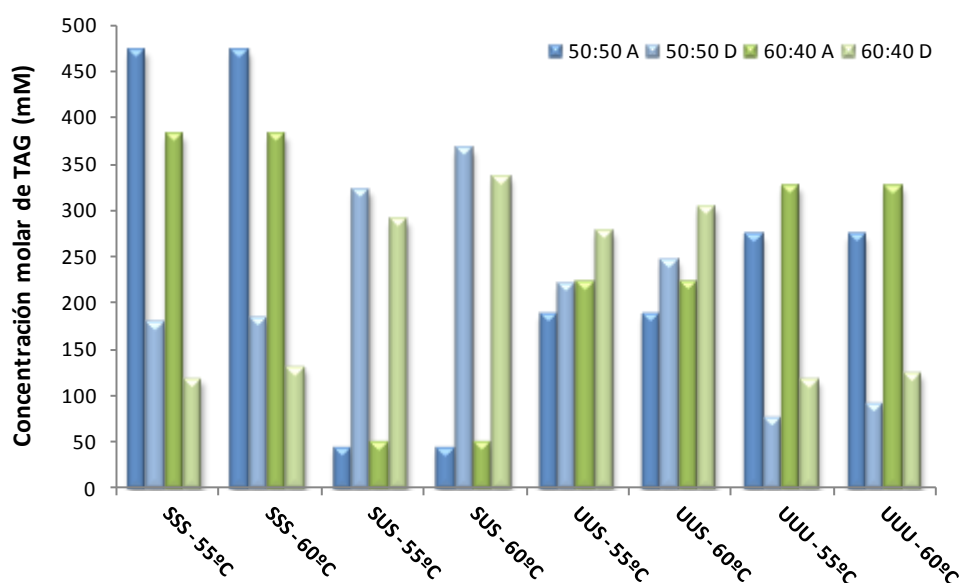
(d)

**Figura 4.11. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU en presencia de hexano. Condiciones: 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM,  $3 \text{ mL}_{\text{hexano}}/g_{\text{sust.}}$ , 230 rpm. SO:FHSO (% m/m): 50:50 y 60:40. Concentraciones en base libre de solvente.

Para ambas relaciones de sustratos, un cambio de temperatura de 55 a 60°C parecería generar cambios apreciables en la formación o desaparición de los diferentes grupos de TAG, pero este efecto resulta menor para el caso de los SSS y más marcado para aquellos TAG que incrementan su concentración con el tiempo (SUS y UUS). Esto

parece indicar que con la temperatura se incrementa la velocidad relativa de reesterificación, aunque debe hacerse notar que esta variable también afecta las relaciones de equilibrio.

En cuanto al cambio producido por una modificación en las relaciones de sustratos, al igual que en los sistemas libres de solvente, éstos son notablemente significativos. En la Figura 4.12. se grafican las concentraciones iniciales y finales (48 h) de cada grupo de TAG para ambas relaciones de sustratos consideradas.



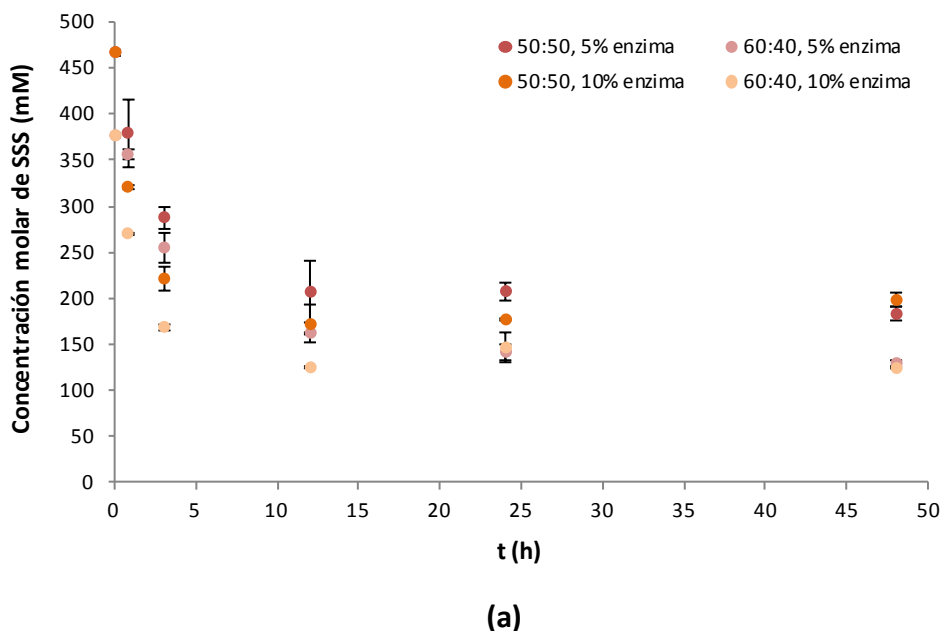
**Figura 4.12.** Concentraciones molares (mM) de los diferentes grupos de TAG para ambos sustratos y para las distintas relaciones SO:FHSO (% m/m), antes (A) y después (D) del proceso de interesterificación (48 h) en presencia de hexano. Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, SO:FHSO (% m/m): 50:50, 3 mL<sub>hexano</sub>/g<sub>sust.</sub>, 230 rpm. Concentraciones en base libre de solvente.

La reducción en la concentración total de TAG al disminuir la temperatura de 60 a 55°C se debe principalmente a las diferencias encontradas en los grupos de TAG mixtos (SUS y UUS), en particular SUS. Como puede observarse en la Figura 4.10. este grupo de TAG además resultó ser el que mayores cambios porcentuales sufrió luego de la modificación enzimática (aproximadamente 550% en promedio a 55°C y 650% para 60°C, para ambas relaciones SO:FHSO). Por otro lado, al igual que en los sistemas libres de solvente, el grupo UUS fue el que se modificó en menor medida (aproximadamente

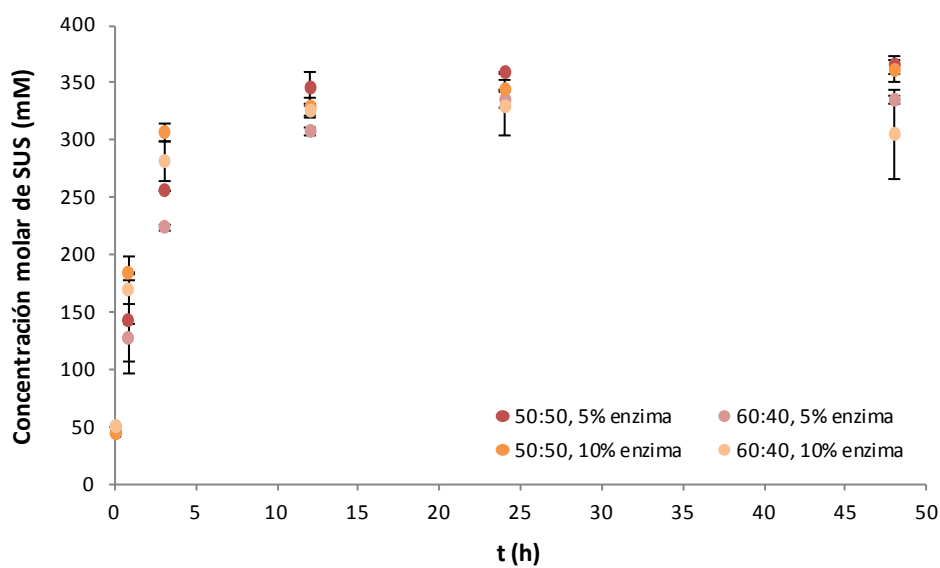
20 y 33% para 55 y 60°C, respectivamente). En cuanto a los porcentajes de disminución observados en los TAG de los grupos SSS y UUU, éstos fueron absolutamente comparables para la totalidad de las condiciones estudiadas, rondando el 65%.

Si se comparan estos valores con aquellos correspondientes a los sistemas libres de solvente (reducciones de 64% y 70 % para SSS y UUU e incrementos de 610% y 19% para SUS y UUS, obtenidos como valores promediados para las relaciones de sustratos 50:50 y 60:40), se observa que ambos conjuntos de datos son comparables. Sin embargo, no es posible realizar una evaluación del efecto puro del agregado de solvente sobre estos parámetros debido a que no es factible contar con datos a igual temperatura para ambos sistemas.

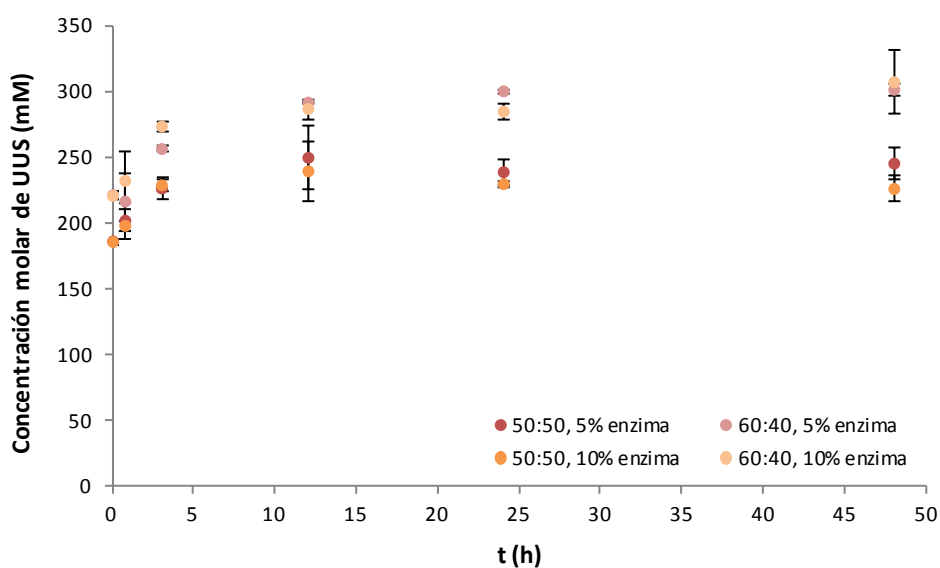
Con el objetivo de evaluar el efecto de un cambio en la concentración de biocatalizador sobre los diferentes grupos de TAG en los sistemas con agregado de hexano, en la Figura 4.13. se presentan los perfiles obtenidos en ambas condiciones.



**Figura 4.13.** Perfiles de concentración en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU en presencia de hexano. Condiciones: Lipozyme RM IM, 3 mL<sub>hexano</sub>/g<sub>sust.</sub>, 60°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 5 y 10%, SO:FHSO (% m/m): 50:50 y 60:40. Concentraciones en base libre de solvente.

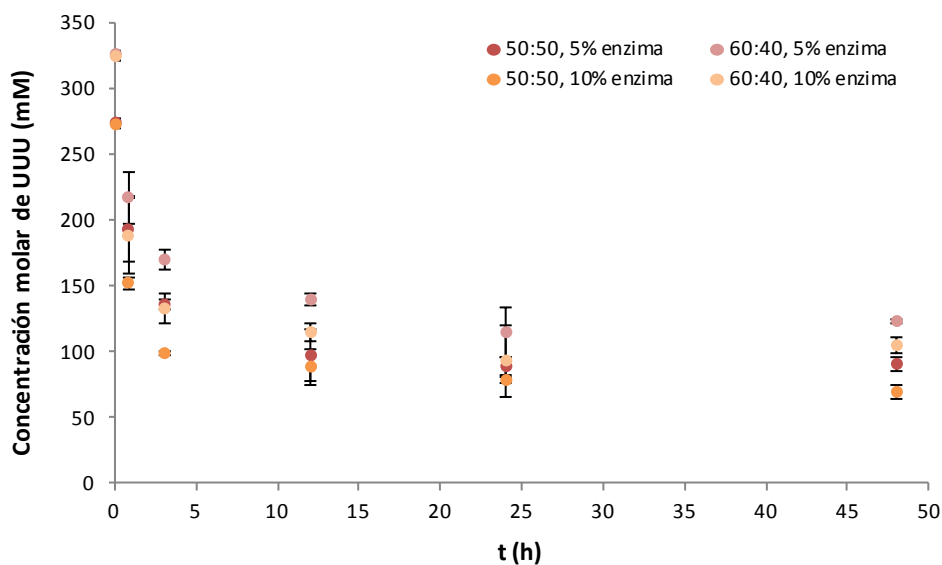


(b)



(c)

**Figura 4.13. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo orrespondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU en presencia de hexano. Condiciones: Lipozyme RM IM,  $3 \text{ mL}_{\text{hexano}}/\text{g}_{\text{sust.}}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 230 rpm. Concentración de enzima (%  $\text{m}/\text{m}_{\text{sust.}}$ ): 5 y 10%, SO:FHSO (%  $\text{m}/\text{m}$ ): 50:50 y 60:40. Concentraciones en base libre de solvente.



(d)

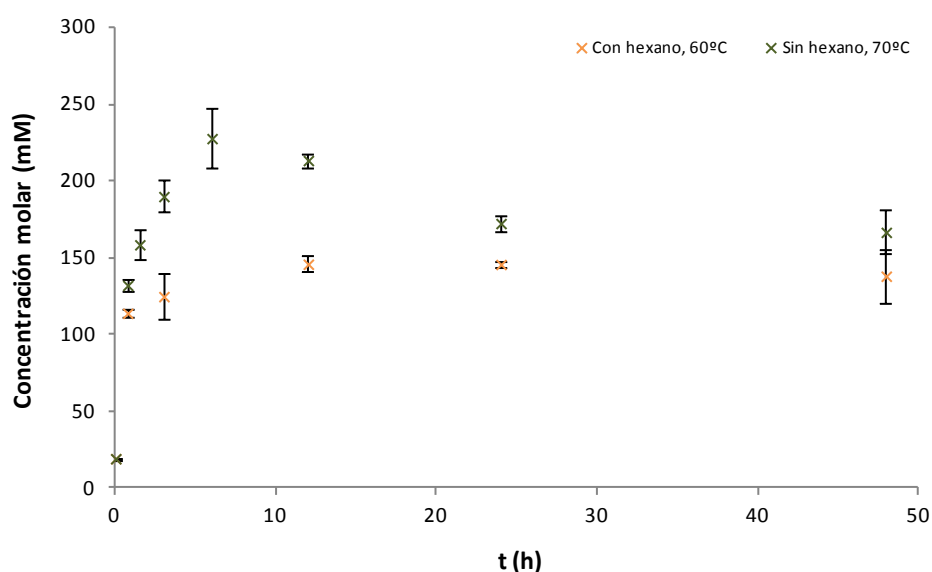
**Figura 4.13. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU en presencia de hexano. Condiciones: Lipozyme RM IM,  $3 \text{ mL}_{\text{hexano}}/\text{g}_{\text{sust.}}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 230 rpm. Concentración de enzima (%  $\text{m}/\text{m}_{\text{sust.}}$ ): 5 y 10%, SO:FHSO (%  $\text{m}/\text{m}$ ): 50:50 y 60:40. Concentraciones en base libre de solvente.

Al igual que en el caso de los sistemas libres de hexano, y como es de esperar, las mayores concentraciones de los TAG producidos con predominio de ácidos grasos saturados (SUS) se obtienen partiendo de las mezclas con mayor proporción de FHSO, donde estos son mayoritarios; mientras que los perfiles de concentración de TAG diinsaturados (UUS) son mayores para la mezcla 60:40.

El aumento en la concentración de enzima de 5 a 10% produjo un incremento marcado en las velocidades iniciales de reacción, evidenciándose claramente en los gráficos presentados para ambas relaciones de sustratos.

En cuanto a los valores de equilibrio alcanzados por los diferentes grupos de TAG para ambas concentraciones de enzima, y a pesar de las tendencias que se observan en los gráficos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos relaciones de sustratos consideradas, a excepción del grupo UUU, para el cual sí se evidencian valores de equilibrio diferentes según la carga de enzima que se considere.

En la Figura 4.14. se presentan perfiles superpuestos de la concentración de DAG para reacciones llevadas a cabo en presencia y ausencia de solvente. El objetivo de dicho gráfico es comparar principalmente el formato de las curvas y no los valores puntuales ya que, como se indicó anteriormente, éstos fueron obtenidos a diferentes temperaturas; por lo tanto no sería posible evaluar de manera independiente el efecto del agregado de solvente al medio de reacción. Se presentan los datos obtenidos con una concentración de enzima de 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ), obteniéndose resultados comparables cuando se utilizan los datos correspondientes a la menor concentración (5%).



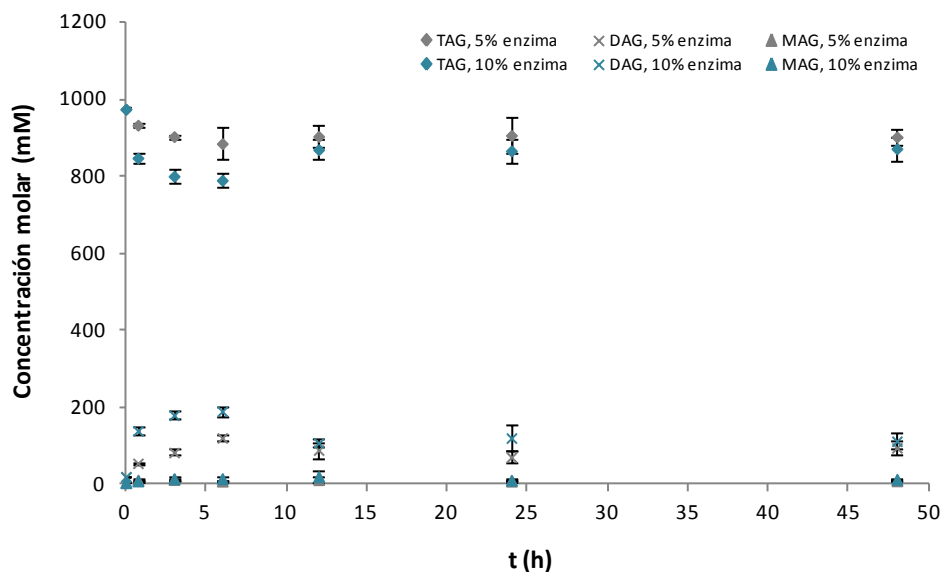
**Figura 4.14.** Perfiles de concentración de DAG en función del tiempo, para reacciones llevadas a cabo en presencia y ausencia de hexano. Condiciones: 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM, SO:FHSO (%  $m/m$ ): 50:50, 230 rpm. Datos con hexano:  $3 \text{ mL}_{\text{hexano}}/\text{g}_{\text{sust.}}$ , concentraciones en base libre de solvente.

Si bien no se cuentan con datos a las 6 h de reacción para el sistema con agregado de hexano, parecería que el perfil obtenido para el mismo no poseería un máximo. Los resultados indican que la relación entre las velocidades netas de hidrólisis y de esterificación al principio de la reacción es mayor para la reacción sin solvente a 70°C que con 3 ml de hexano por gramo de sustratos a 60°C. Esto demuestra que existirían marcadas diferencias en la cinética de ambos sistemas, debido al efecto conjunto del solvente y de la temperatura sobre los diferentes mecanismos de reacción.



## 4.3.2.2. LIPOZYME TL IM

En la Figura 4.15. se muestra la evolución de las composiciones de glicéridos en el tiempo para una única relación de sustratos, la cual es representativa de las tres consideradas. Se muestran los datos obtenidos para un agregado de 5 y 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de enzima.



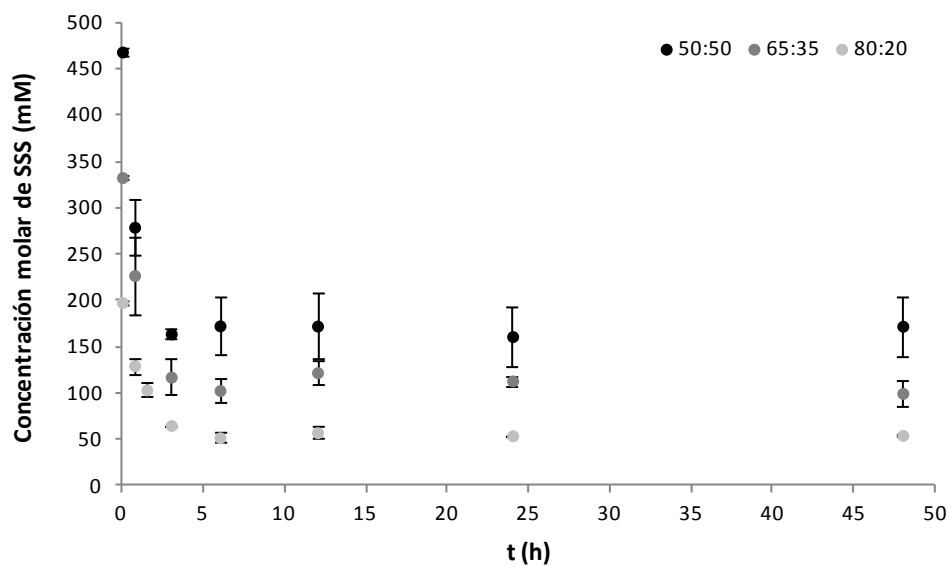
**Figura 4.15.** Perfiles de concentración en el tiempo para TAG, DAG y MAG. Condiciones: Lipozyme TL IM, SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (%  $m/m_{\text{sust.}}$ ): 5 y 10%.

Como en el caso de Lipozyme RM IM, la concentración de TAG disminuye durante aproximadamente las 6 primeras horas de reacción, alcanzando un mínimo relativo, y luego aumenta hasta estabilizarse finalmente en sus valores de equilibrio. De manera inversa, la concentración de DAG aumenta inicialmente hasta aproximadamente las 6 h de reacción para luego alcanzar su valor final de equilibrio alrededor de las 12 h. Por otra parte, las concentraciones de MAG resultaron despreciables frente a las correspondientes a las restantes especies, aunque siguen un comportamiento similar a los DAG. Kim et al. (2008) obtuvieron resultados similares respecto al tiempo de reacción (6 h) para el cual se presentan los mayores cambios de composición durante la interesterificación de aceite de oliva y aceite de canola totalmente hidrogenado con Lipozyme TL IM a 70°C. Sin embargo, dichos autores

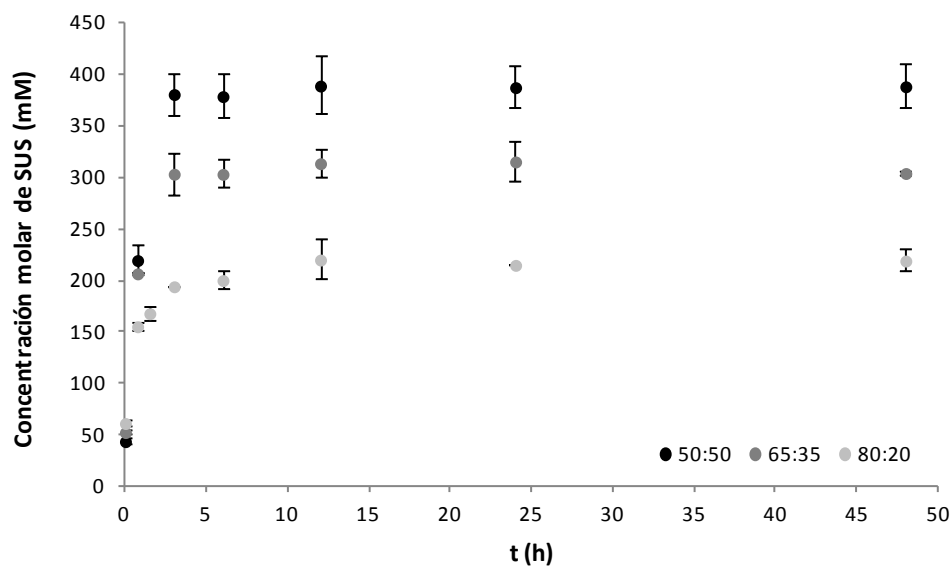
encontraron que el equilibrio se alcanzaba a las 24 h. Esta diferencia podría deberse a las diferentes concentraciones de lipasa utilizadas en ambos casos: 5% en la presente tesis y 1% en dicho trabajo.

El aumento en la concentración de lipasa agregada al sistema genera cambios importantes en los perfiles cinéticos. Estos cambios se evidencian de manera muy marcada durante las primeras horas de reacción (hasta aproximadamente las 6 h), reduciéndose luego y alcanzándose incluso valores de equilibrio comparables para cada grupo de glicéridos. Un aumento en la concentración de enzima incrementa la velocidad inicial de hidrólisis y, en consecuencia, la generación de subproductos. En el equilibrio las diferencias son menores, e incluso resultan no significativas desde el punto de vista estadístico, pero las tendencias pueden ser explicadas en términos del mayor contenido de agua en el sistema aportado por la enzima.

A continuación se presentan los perfiles de concentración correspondientes a los cuatro grupos de TAG (SSS, SUS, UUS, UUU) para las tres relaciones de sustratos utilizadas en las mezclas reactivas iniciales y una concentración de enzima de 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) (Figura 4.16.).

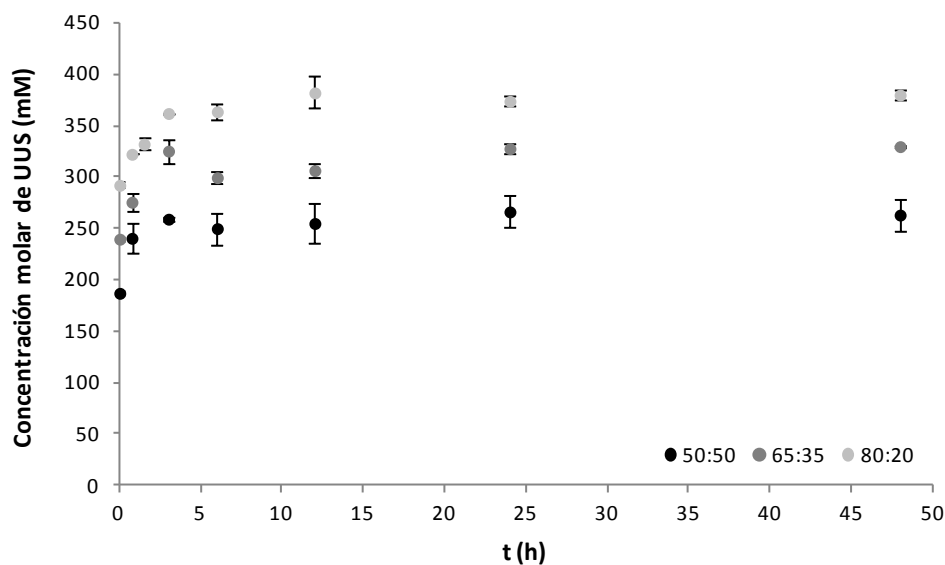


(a)

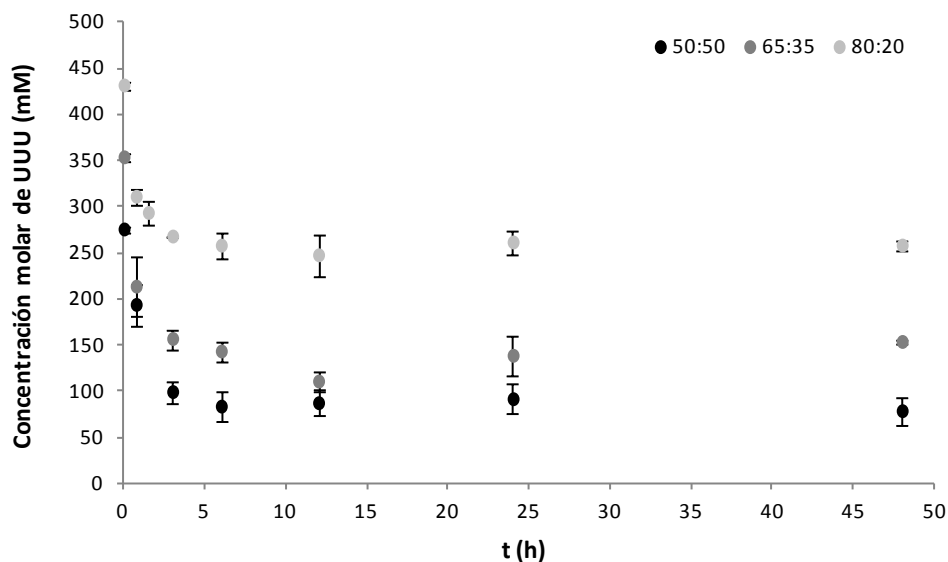


(b)

**Figura 4.16.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm.



(c)



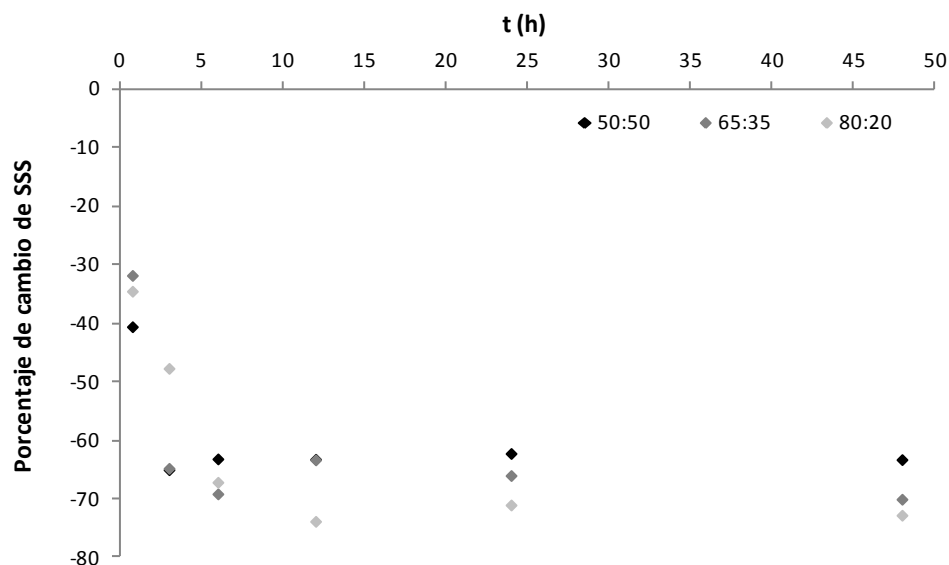
(d)

**Figura 4.16. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm.

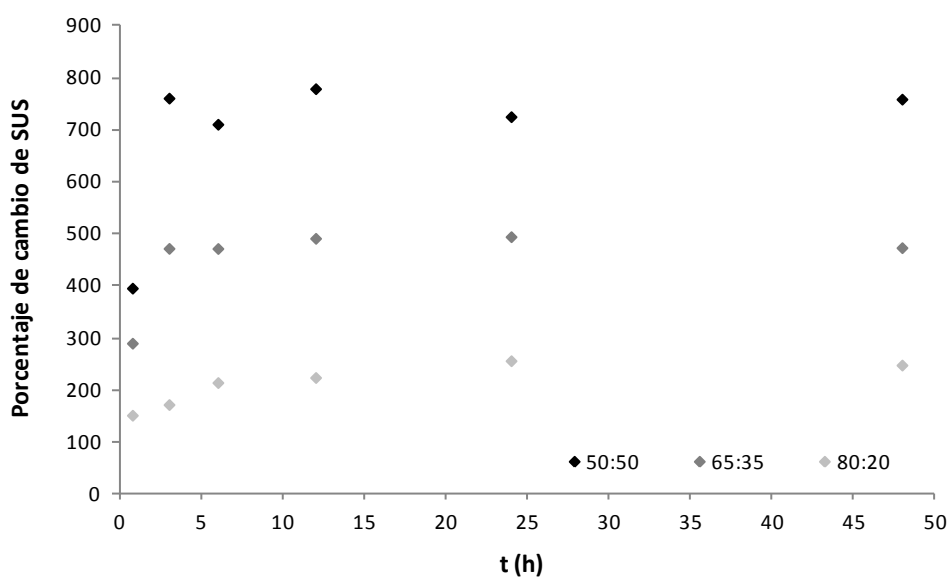
Realizando un análisis por grupo de TAG, se puede observar que las curvas obtenidas para las distintas mezclas iniciales poseen tendencias similares, aunque toman valores marcadamente diferentes especialmente a partir de las 3 h de reacción. Finalmente la totalidad de los TAG alcanza valores de equilibrio diferentes, asociado a su concentración inicial y a las de sus ácidos grasos en las mezclas de reacción. Al igual

que con Lipozyme RM IM la concentración de TAG trisaturados (SSS) y triinsaturados (UUU) decrece a lo largo del tiempo hasta alcanzar el equilibrio, aunque en este caso parece evidenciarse más marcadamente la formación de un mínimo relativo (Figura 4.13.). En cambio, la concentración de TAG con uno y dos ácidos grasos insaturados (SUS y UUS) crece rápidamente a medida que avanza la interesterificación, alcanzando en menor tiempo valores cercanos a los de equilibrio.

El efecto de la relación de sustratos sobre la cinética puede visualizarse mejor cuando los datos de la Figura 4.16. se normalizan con la respectiva concentración inicial (Figura 4.17.). De la misma manera en la que se procedió en el caso de Lipozyme RM IM, no se grafican los cambios relativos correspondientes a UUS debido a que los absolutos no resultaron importantes. Para los restantes tres grupos se pueden observar comportamientos similares a los reportados en la Sección 4.3.2.1. para Lipozyme RM IM. En la Figura 4.17. (a) puede apreciarse que los cambios en la concentración de SSS aumentan moderadamente con el incremento en la proporción de SO en el sustrato. La tendencia es inversa en el caso de la concentración de UUU (Figura 4.17. (b)), y para este grupo de TAG la variación es significativamente mayor. Los cambios en la concentración de SUS, por su parte, son muy dependientes de la relación inicial SO:FHSO (Figura 4.17. (c)), obteniéndose los mayores incrementos cuando se partió de mezclas con mayor contenido de FHSO. En forma comparativa, los cambios en la concentración de UUS resultaron los menos apreciables (siendo de, como máximo, 38%), aunque por el accionar de esta enzima no se observaron valores negativos en los tiempos iniciales.

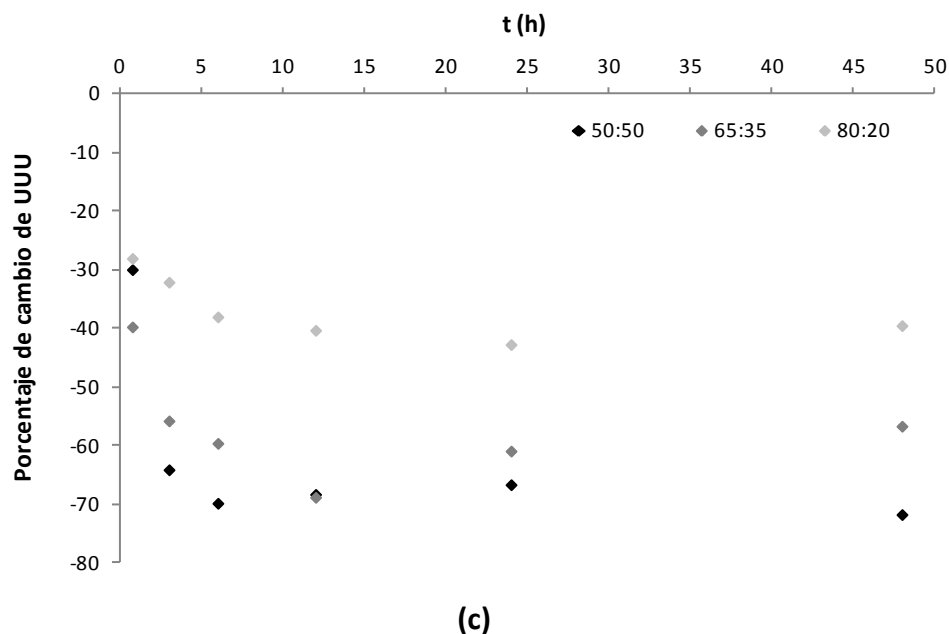


(a)



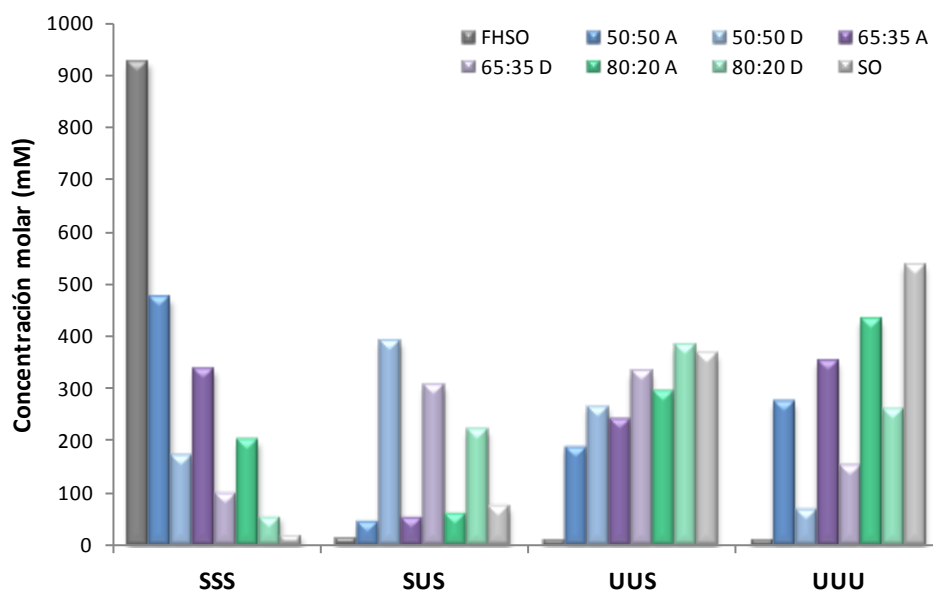
(b)

**Figura 4.17.** Porcentajes de cambio de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS y (c) UUU. Condiciones de reacción: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm.



**Figura 4.17. (cont.)** Porcentajes de cambio de concentración de TAG en el tiempo para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS y (c) UUU. Condiciones de reacción: 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm.

En la Figura 4.18. se muestran esquemáticamente las concentraciones molares en el equilibrio (48 h) de los cuatro grupos de TAG obtenidos a partir de las diferentes mezclas reactivas iniciales para ambas concentraciones de (5 y 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ )). Las composiciones de ambos sustratos se incluyen también en dicha figura.

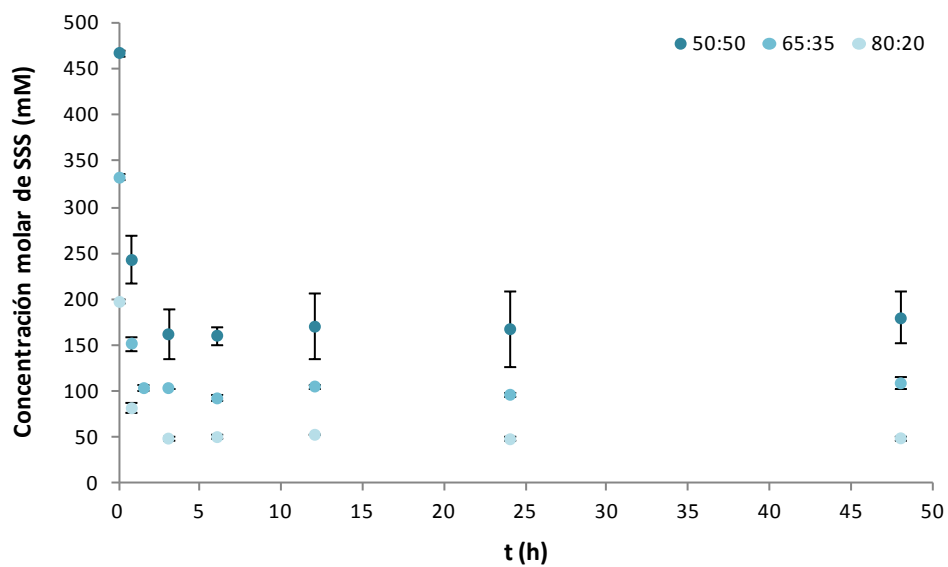


**Figura 4.18.** Concentraciones molares (mM) de los diferentes grupos de TAG para ambos sustratos y para las distintas relaciones SO:FHSO (% m/m), antes (A) y después (D) del proceso de interesterificación (48 h). Condiciones: 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm.

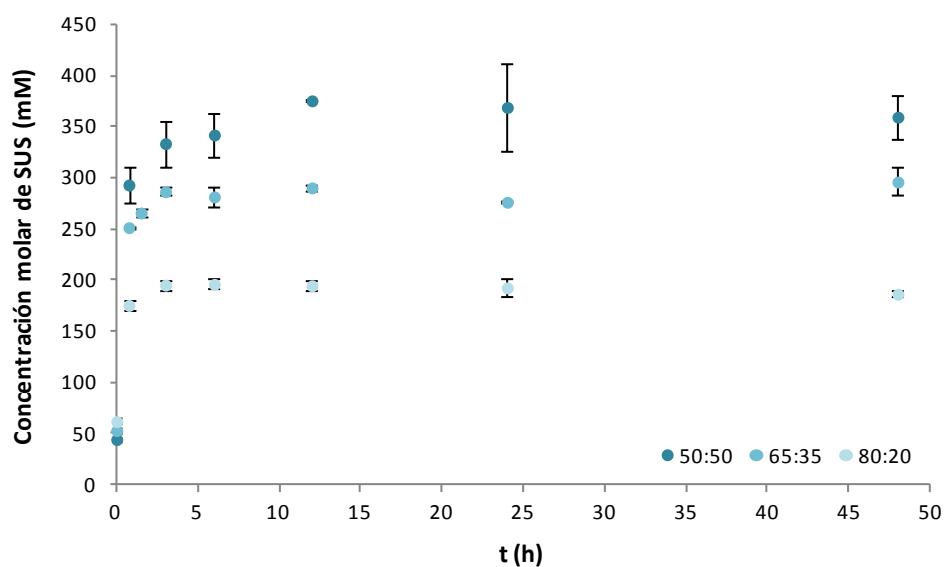
La redistribución de los ácidos grasos sobre los glicéridos presentes en las mezclas iniciales como producto de la reacción enzimática produjo cambios diferenciales en los distintos grupos de TAG considerados. Al igual que para el caso de Lipozyme RM IM, el grupo de los TAG disaturados resultó ser el que sufrió la mayor variación, con incrementos que varían entre 780 y 255% para las relaciones de sustratos 50:50 y 80:20, respectivamente. En forma relativa la concentración de los UUS se modificó en menor medida, con incrementos del orden del 30%, aunque a diferencia de lo mostrado en la Figura 4.6. para Lipozyme RM IM, con Lipozyme TL IM se obtuvieron valores mayores que incluso superan la concentración de UUS presente en SO. Con respecto a los TAG trisaturados (SSS) y triinsaturados (UUU), su porcentaje de reducción aumenta con su concentración en las muestras de reacción, encontrándose en el rango 63 - 73% para SSS y 71 - 40% para UUU.

Para las reacciones llevadas a cabo con una concentración de enzima del 10% (m/m<sub>sust.</sub>), se obtuvieron los perfiles presentados en la Figura 4.19.



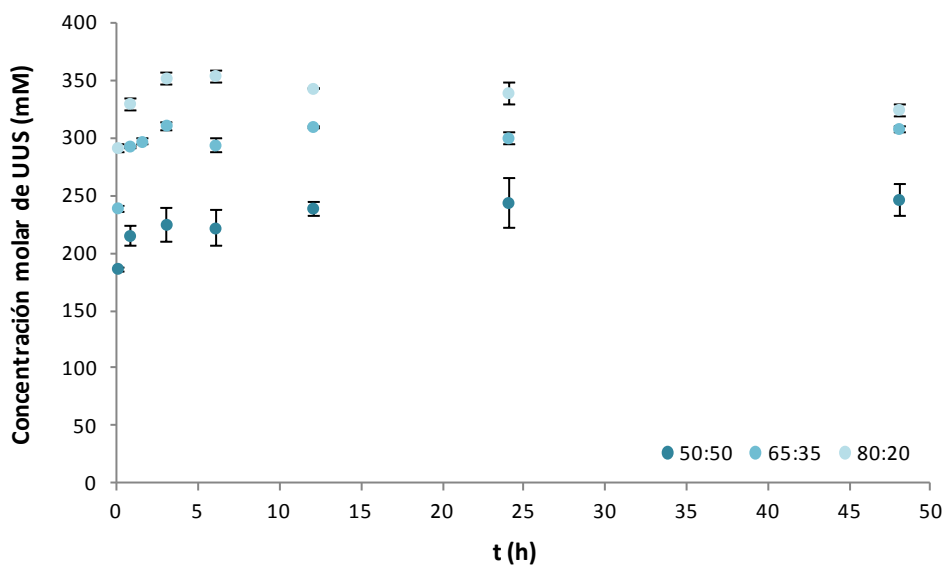


(a)

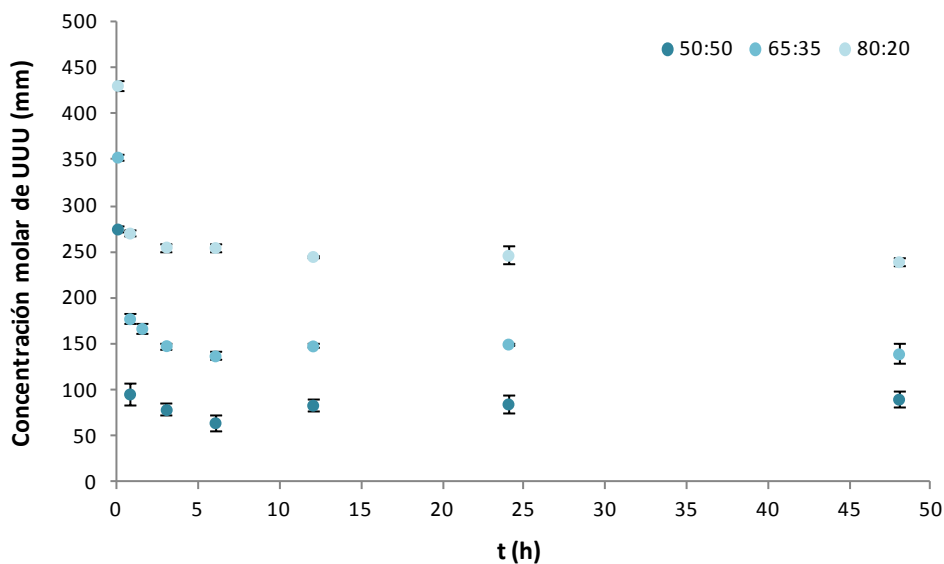


(b)

**Figura 4.19.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo, para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 10%.



(c)



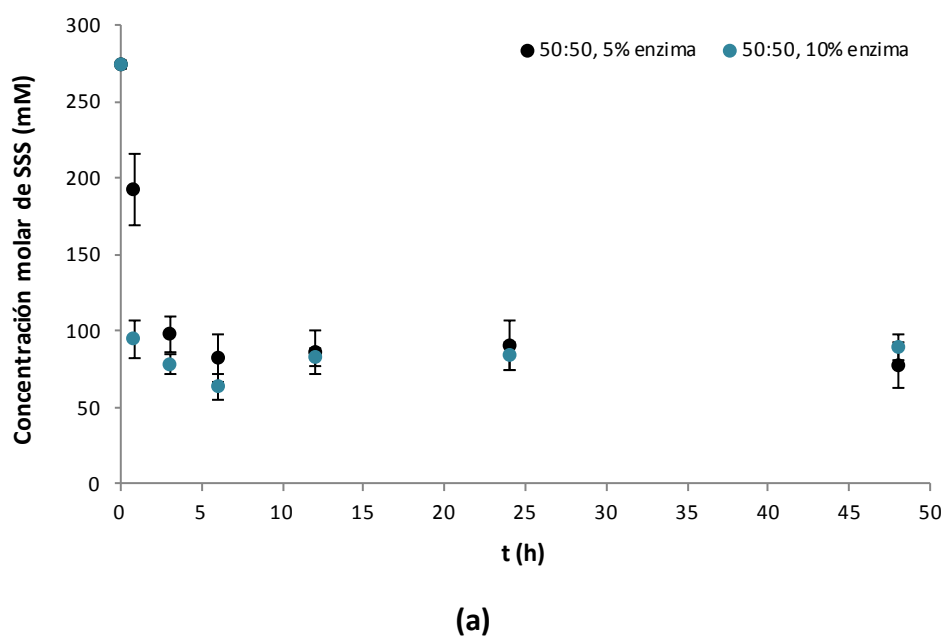
(d)

**Figura 4.19. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo, para diferentes relaciones SO:FHSO (% m/m) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme TL IM, 70°C, 230 rpm. Concentración de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>): 10%.

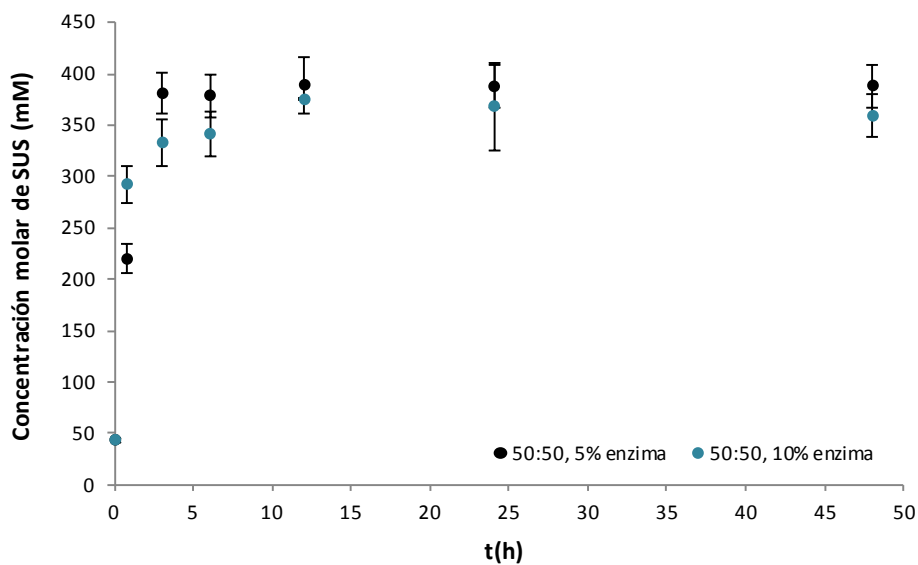
Comparando los perfiles de los distintos grupos de TAG obtenidos para todas las relaciones de sustratos utilizando un 10% de Lipozyme TL IM (Figura 4.19.) con los correspondientes a un 5% de esta misma lipasa (Figura 4.16.), se observan curvas cinéticas y tendencias similares; aunque a mayor concentración de biocatalizador en el

medio de reacción se evidencia el aumento que se obtiene en la velocidad relativa de hidrólisis inicial sobre los SSS y UUU.

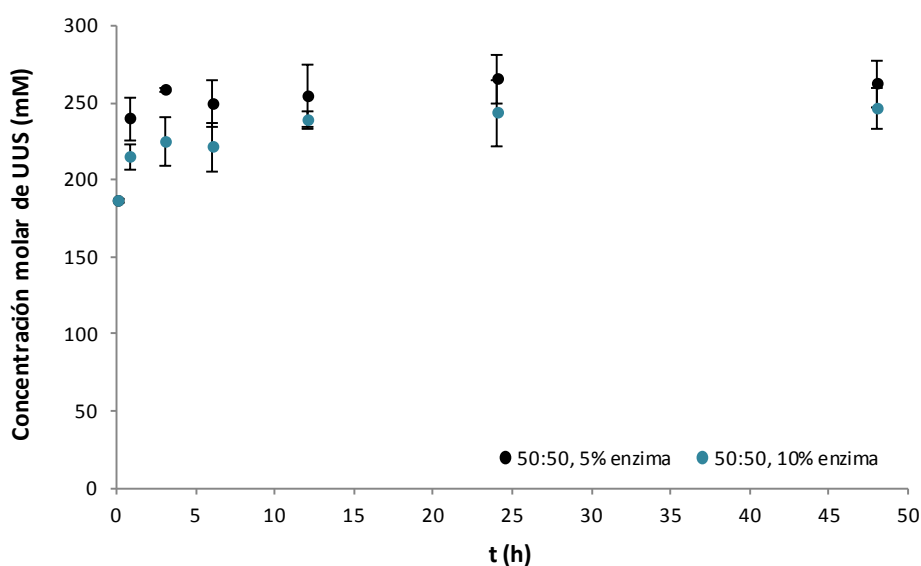
Con el objetivo de realizar una mejor comparación del comportamiento de la cinética de la reacción al incrementar el contenido de enzima en un 100%, en la Figura 4.20. se representan los perfiles de los cuatro grupos de TAG correspondientes a ambas cargas de enzima para una relación 50:50 (% m/m).



**Figura 4.20.** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes concentraciones de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme TL IM, SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm.

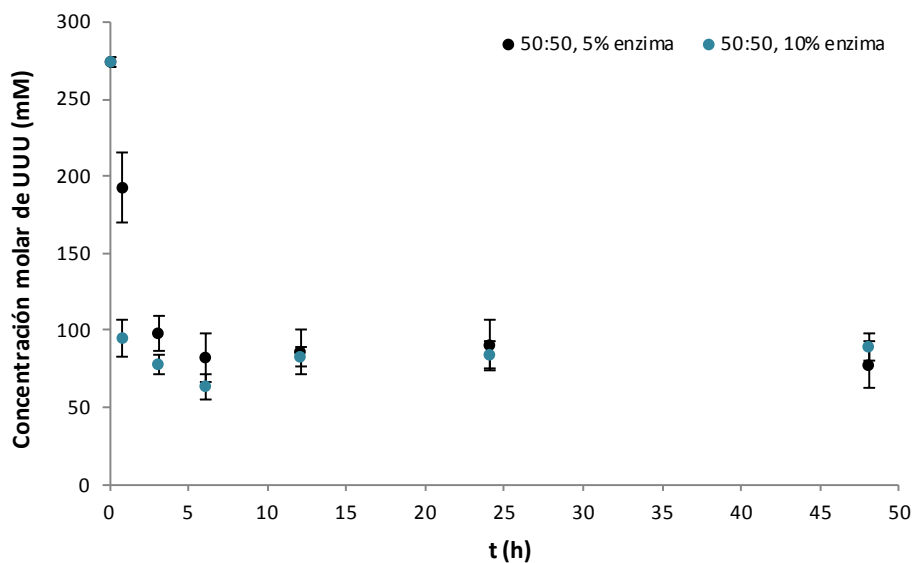


(b)



(c)

**Figura 4.20. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes concentraciones de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme TL IM, SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm.



(d)

**Figura 4.20. (cont.)** Perfiles de concentración de TAG en el tiempo para diferentes concentraciones de enzima (% m/m<sub>sust.</sub>) correspondientes a (a) SSS, (b) SUS, (c) UUS y (d) UUU. Condiciones: Lipozyme TL IM, SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm.

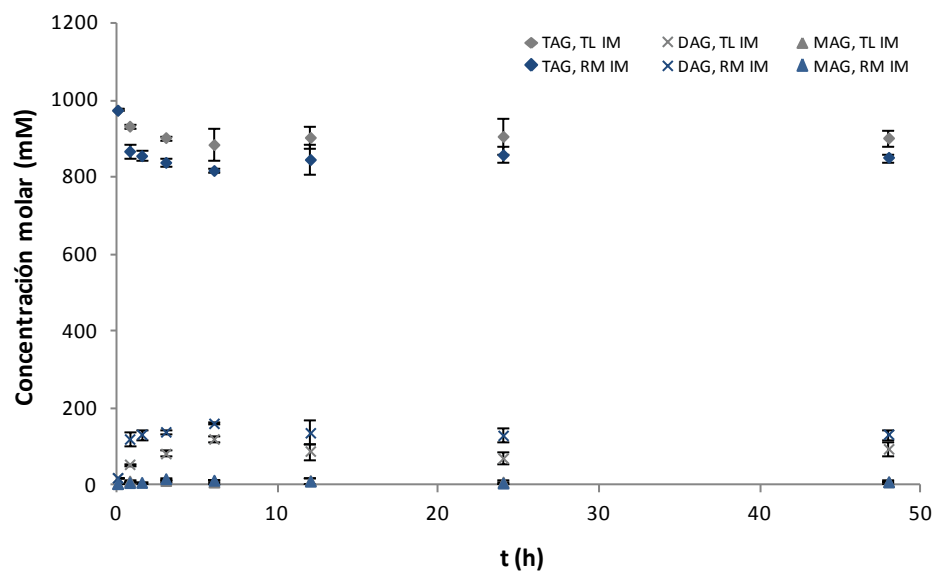
Tal como se mencionó anteriormente, las velocidades iniciales correspondientes a los sistemas con mayor concentración de lipasa resultaron ser significativamente mayores para tres de los cuatro grupos de TAG. En el caso de los TAG disaturados (SUS), el comportamiento se revierte una vez superado el estado inicial (luego de 45 min), observándose concentraciones de SUS inferiores cuando se utilizó mayor concentración de enzima. Por otro lado, la concentración de los TAG diinsaturados (UUS), los cuales mostraron el menor porcentaje de cambio en el equilibrio respecto a sus concentraciones iniciales, fueron inferiores desde los primeros tiempos de reacción, cuando se trabajó con el nivel superior de enzima. Este comportamiento podría relacionarse con un cambio en la velocidad relativa de hidrólisis respecto a la de esterificación, principalmente dado por la mayor incorporación de agua junto con el biocatalizador. Esto se encuentra en concordancia con el comportamiento que evidencia el grupo de TAG ( Figura 4.15).

En cuanto a los valores de equilibrio alcanzados para ambas condiciones, a pesar de las tendencias observadas en los gráficos, no se encontraron diferencias

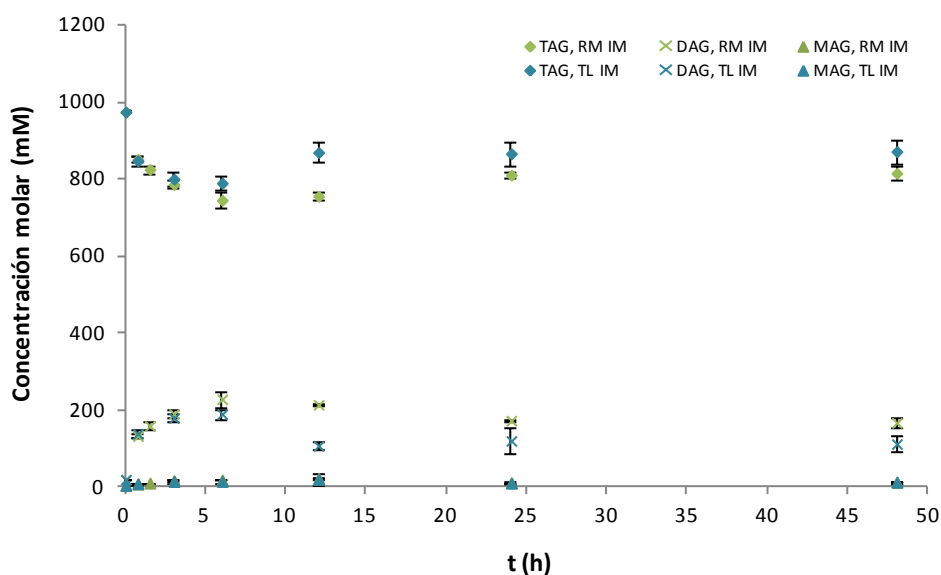
significativas para ninguno de los cuatro grupos de TAG considerados al analizarse estadísticamente los datos.

#### 4.3.2.3. COMPARACIÓN ENTRE LIPASAS

A modo comparativo del comportamiento cinético del sistema de reacción con ambas enzimas, a continuación se reproducen los resultados presentados en las Figuras 4.3. y 4.15., para una relación de sustratos 50:50 y una concentración de enzima de 5% (Figura 4.21. (a)) y 10% (Figura 4.21. (b)). Puede notarse que las tendencias al cambio en las distintas concentraciones son similares, aunque arribando a niveles de concentración levemente distintos. Con Lipozyme RM IM se observó mayor velocidad relativa de hidrólisis inicial (mayor disminución en la concentración de TAG e incremento de la concentración de DAG) principalmente para el nivel de 5% de enzima. Criado et al. (2007a) encontraron que la conversión (basada en los TAG mayoritarios de uno de los sustratos) a 1 h de reacción, durante la interesterificación enzimática de aceite de oliva extra virgen y aceite de palma totalmente hidrogenado catalizada por Lipozyme RM IM y TL IM, resultó ser mayor para la primera, resultado opuesto al obtenido en la presente tesis. Las concentraciones alcanzadas en el estado de equilibrio fueron similares para Lipozyme TL IM, prácticamente independientes de la concentración de esta lipasa. En este caso tampoco se encontró una variación apreciable en el tiempo de reacción en que se alcanzó dicho equilibrio (aproximadamente 12 h). Por otro lado, con Lipozyme RM IM sí se modificaron los valores de equilibrio y el tiempo en que se alcanzó éste al aumentar la concentración de biocatalizador (de 12 a 24 h).



(a)



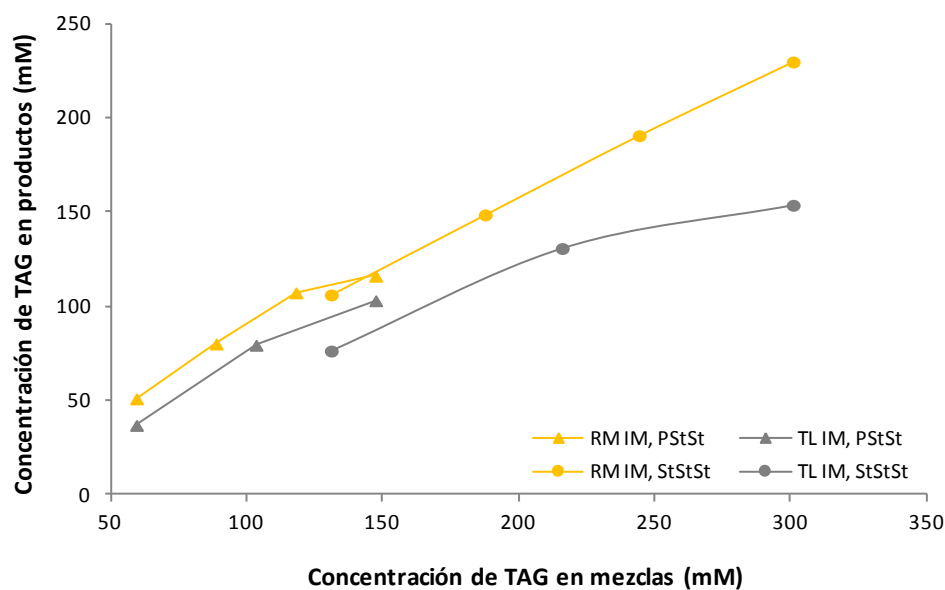
(b)

**Figura 4.21.** Comparación de los perfiles de concentración en el tiempo para TAG, DAG y MAG correspondientes a una concentración de (a) 5% y (b) 10% ( $m/m_{sust.}$ ) de ambas lipasas. Condiciones: SO:FHSO: 50:50 (% m/m), 70°C, 230 rpm.

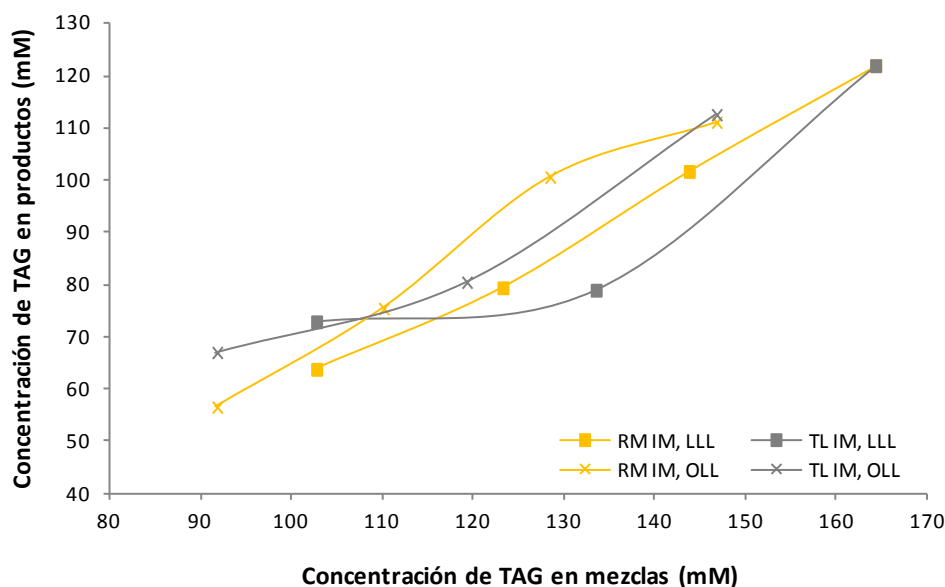
En la Tabla 4.3. se presentaron las composiciones de los TAG mayoritarios en las mezclas de reacción y en los productos de interesterificación después de 48 h de reacción (estado de equilibrio) para ambas enzimas. Por otra parte, en la Figura 4.2., se

mostró la concentración de equilibrio alcanzada en función de la concentración inicial de estos TAG en las mezclas de reacción.

Para visualizar el desempeño de las enzimas en el etapa inicial, en la Figura 4.22. se presentan las composiciones determinadas para los mismos TAG a un tiempo de reacción de 0.75 h.



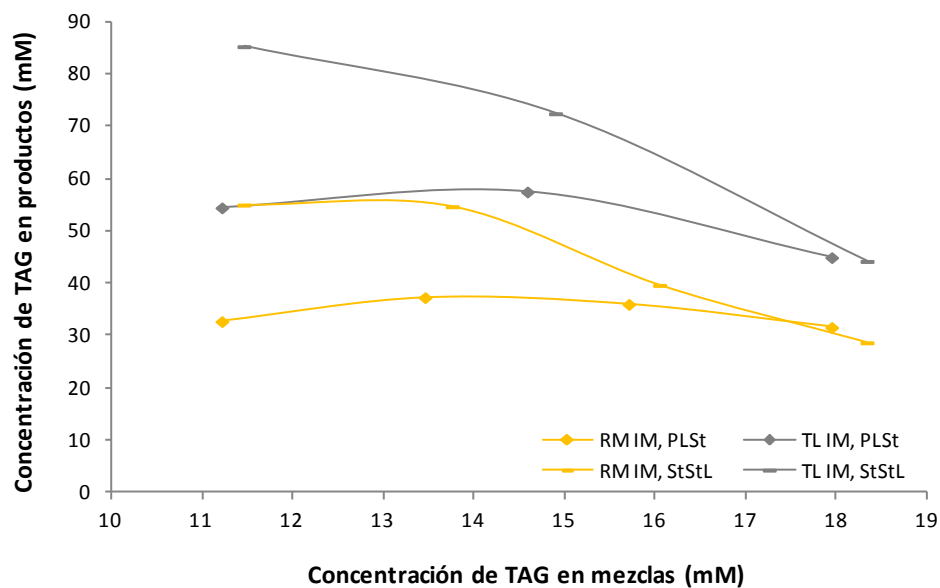
(a)



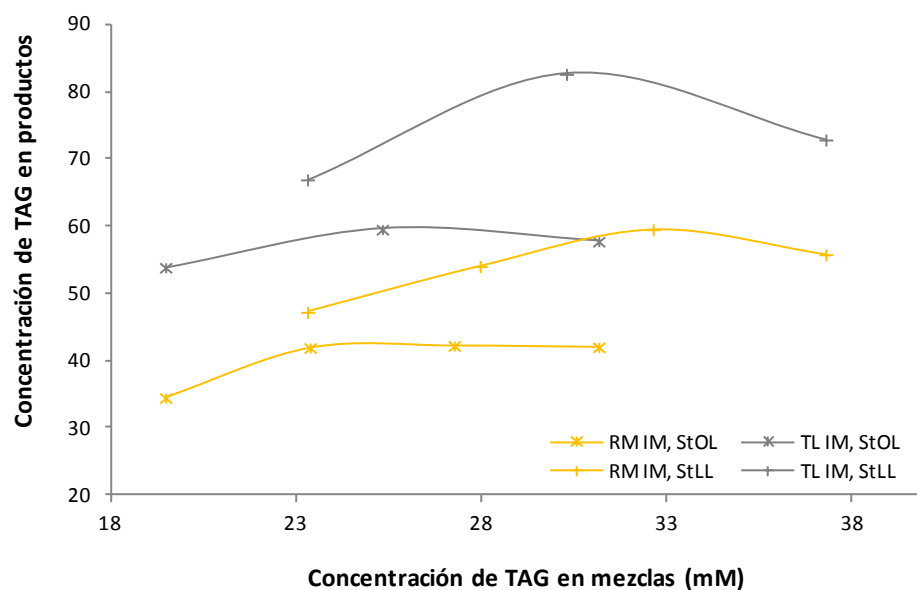
(b)

**Figura 4.22.** Efecto de la interesterificación (0.75 h) sobre la concentración de los TAG mayoritarios para las diferentes relaciones SO:FHSO. Condiciones de reacción: 5% enzima (m/m<sub>sust.</sub>), 70°C, 230 rpm.





(c)



(d)

**Figura 4.22. (cont.)** Efecto de la interesterificación (0.75 h) sobre la concentración de los TAG mayoritarios para las diferentes relaciones SO:FHSO. Condiciones de reacción: 5% enzima ( $m/m_{\text{sust.}}$ ), 70°C, 230 rpm.

Las concentraciones de los TAG trisaturados PStSt y principalmente StStSt (Figura 4.22. (a)) resultaron mayores en las etapas iniciales de la reacción cuando la enzima actuante fue Lipozyme RM IM. Por otra parte, inicialmente no se observaron diferencias importantes para los TAG triinsaturados LLL y OLL (Figura 4.22. (b)), aunque

de acuerdo a la Figura 4.2. en el estado de equilibrio pareciera apreciarse una tendencia a obtenerse concentraciones levemente superiores con Lipozyme TL IM que con RM IM, especialmente para las mezclas con menor concentración de estos TAG. En el caso de PLL (datos no mostrados) no se observaron diferencias significativas entre ambas enzimas.

Inicialmente, con Lipozyme RM IM se genera menor concentración de PLSt, independientemente del nivel inicial de sustratos (Figura 4.22. (c)). Por otra parte, para cada enzima, PLSt se mantiene prácticamente constante, aunque en distintos niveles. A tiempos prolongados, con ambas enzimas se obtuvo un nivel similar de concentración de PLSt, es decir prácticamente independiente de la relación de sustratos SO:FHSO (Tabla 4.3.). En cambio, para StStL (Figura 4.22. (d)), si bien también ocurre que inicialmente Lipozyme RM IM genera menor concentración que Lipozyme TL IM, ésta disminuye con el incremento de la proporción de SO en la mezcla inicial, llegando a igualarse las concentraciones obtenidas con ambas enzimas para la relación 80:20. A tiempos prolongados (Tabla 4.3.), ya sea utilizando una u otra enzima, la concentración de este TAG disminuye con el incremento de la relación SO:FHSO, aunque en niveles similares.

La velocidad inicial de reacción sobre los SSS, grupo compuesto principalmente por StStSt, es menor con Lipozyme RM IM que con TL IM. Inicialmente, ambas enzimas reaccionan a igual velocidad neta (hidrólisis) sobre LLL, OLL y PLL. La velocidad inicial neta (favorecida hacia la reesterificación de los grupos SSU y SUU) es menor con Lipozyme RM IM. Este hecho podría estar relacionado con la velocidad inicial de hidrólisis de SSS. Sin embargo, inicialmente con Lipozyme RM IM se produce mayor concentración de diglicéridos disaturados (StSt y StP) (37.11 - 45.56 mM versus 15.78 - 22.76 mM con Lipozyme TL IM)<sup>1</sup>, con lo cual se concluye que la explicación residiría en los valores de las constantes cinéticas de hidrólisis (de ácidos grasos saturados, principalmente de St) y reesterificación (P e insaturados): ambas serían mayores para Lipozyme TL IM.

---

<sup>1</sup> Se reportan rangos de valores debido a la superposición de especies detallada en la sección 2.2.9.2.3.

En cuanto al efecto de la relación de sustratos sobre el comportamiento cinético (desde el punto de vista de los cambios generados en los distintos grupos de TAG), la única diferencia presentada por las enzimas utilizadas fue que con Lipozyme RM IM prevaleció inicialmente la hidrólisis de UUS y, luego de un cierto tiempo, progresó la reesterificación neta. Por el contrario, en los sistemas con presencia de Lipozyme TL IM, la concentración de este grupo de TAG, si bien en menor magnitud que los restantes tres, siempre aumentó.

#### 4.4. CONCLUSIONES

Los TAG mayoritarios en las mezclas de SO y FHSO son PStSt, PLL, StStSt, OLL y LLL. Con la interesterificación enzimática se lograron modificar las relaciones entre las especies de TAG, obteniéndose también un cierto porcentaje de subproductos (principalmente DAG y FFA, y en mucha menor proporción MAG). Los TAG mayoritarios en las mezclas iniciales tendieron a disminuir su concentración, dando lugar a la elevación del contenido de otras especies: PLSt, StStL, StOL y StLL.

Los perfiles respecto a la variación de la concentración de los TAG y subproductos con el transcurso de la reacción fueron similares para ambas enzimas utilizadas (Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM), mostrando valores mínimos en los TAG y máximos en los subproductos. Sin embargo, los niveles de estas concentraciones variaron según la enzima empleada. El grupo de TAG que aumentó principalmente su concentración fue el de los disaturados (SUS). Por el contrario, la concentración de los SSS y UUU disminuyó al progresar el tiempo de reacción hasta alcanzar el equilibrio, indicando que sobre ellos siempre predominó la velocidad neta de desaparición por hidrólisis en lugar de la de generación por reesterificación.

En cuanto al efecto de la relación de sustratos sobre la cinética, se encontró que los cambios en la concentración de SUS resultan ser muy dependientes de esta relación. Los productos obtenidos a partir de mezclas con mayor contenido de FHSO presentaron los mayores cambios en su composición de SUS. A mayores relaciones SO:FHSO se obtuvieron incrementos porcentuales levemente mayores en la

concentración de SSS y disminuciones más notorias en la concentración de UUU. En cuanto al grupo de TAG restante, con Lipozyme TL IM la concentración del mismo aumentó monótonamente en todos los casos (aunque en menor magnitud que los restantes tres grupos), mientras que en los sistemas con presencia de Lipozyme RM IM se presentó inicialmente un cierto grado de hidrólisis.

Al aumentar el nivel de enzima en el sistema de reacción con Lipozyme RM IM, se elevó el contenido de productos secundarios en todo el rango de tiempo considerado, alcanzando incluso niveles de equilibrio diferentes. Este hecho está directamente relacionado con la disminución en la concentración final de TAG. Los SSS y UUU disminuyeron más velozmente en los primeros tiempos de reacción, mientras que para el caso de los SUS se encontró una elevación en la velocidad inicial neta favoreciendo su formación.

Por otro lado, cuando se evaluó el efecto de la concentración de Lipozyme TL IM sobre la cinética de reacción, se encontró que su aumento generaba, inicialmente, mayor velocidad neta de hidrólisis, aunque finalmente el sistema se equilibraba en los mismos valores de concentración de cada compuesto.

La incorporación de hexano al medio de reacción, junto con la disminución de la temperatura de reacción, generó cambios en la forma de los perfiles de las distintas concentraciones de productos en el tiempo: ya no se encontraron mínimos en los perfiles de TAG ni máximos en los de subproductos. Por otro lado, el aumento de la concentración de enzima en el rango considerado aumentaría la velocidad de reacción neta inicial (favorecida hacia la hidrólisis) pero no modificaría las concentraciones de equilibrio. La utilización de hexano en el medio de reacción permitió estudiar el efecto de la temperatura en valores inferiores a los analizados en el Capítulo 3. El aumento de la temperatura de reacción de 55 a 60°C favoreció a la velocidad de esterificación por sobre la de hidrólisis y también permitió alcanzar el estado de equilibrio en tiempos de reacción más cortos.

Por último, la velocidad inicial neta de reacción, favorecida hacia la hidrólisis, sobre el total de TAG resultó menor con Lipozyme RM IM que con TL IM. Con ambas enzimas se obtuvo una disminución inicial en la concentración de TAG, para luego

umentar hasta estabilizarse en el valor de equilibrio (generalmente alcanzado a las 24 h de reacción). Los DAG aumentaron inicialmente su concentración, logrando generalmente alcanzar el 70% de incremento en los primeros 45 minutos.

En conclusión, los resultados parecen indicar que tanto la constante cinética de hidrólisis (de ácidos grasos saturados, principalmente de St) como la de reesterificación (P e insaturados) sería mayor para Lipozyme TL IM que para RM IM.

## 4.5. NOMENCLATURA

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

FFA: ácidos grasos libres.

MAG: monoglicéridos.

DAG: diglicéridos.

TAG: triglicéridos.

P: ácido palmítico.

St: ácido esteárico.

O: ácido oleico.

L: ácido linoleico.

Ln: ácido linolénico.

SSS: TAG trisaturado.

SUS: TAG disaturado/monoinsaturado.

UUS: TAG monosaturado/diinsaturado.

UUU: TAG triinsaturado.

## 4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carrín, M. E. y G. H. Crapiste (2008). *Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture*. Journal of Food Engineering. 84(2):243-249.

Criado, M.; E. Hernández-Martín y C. Otero (2007a). *Optimized interesterification of virgin olive oil with a fully hydrogenated fat in a batch reactor: Effect of mass transfer limitations*. European Journal of Lipid Science and Technology. 109(5):474-485.

Criado, M.; E. Hernández-Martín; A. López-Hernández y C. Otero (2007b). *Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat: characterization of the reaction and its products*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 84(8):717-726.

- De Clercq, N.; S. Danthine; M. Nguyen; V. Gibon y K. Dewettinck (2012). *Enzymatic Interesterification of Palm Oil and Fractions: Monitoring the Degree of Interesterification using Different Methods*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 89(2):219-229.
- Ibrahim, N.; Z. Guo y X. Xu (2008). *Enzymatic Interesterification of Palm Stearin and Coconut Oil by a Dual Lipase System*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85(1):37-45.
- Janssen, A. E. M.; A. M. Vaidya y P. J. Halling (1996). *Substrate specificity and kinetics of Candida rugosa lipase in organic media*. Enzyme and Microbial Technology. 18(5):340-346.
- Jennings, B. y C. Akoh (1999). *Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(10):1133-1137.
- Kim, I.-H.; S.-M. Lee; B.-M. Lee; H.-K. Park; J.-Y. Kim; K.-I. Kwon; J.-W. Kim; J.-S. Lee y Y.-H. Kim (2008). *Interesterification of Olive Oil with a Fully Hydrogenated Fat in a Batch Reactor Using Step Changes in Temperature*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(14):5942-5946.
- Li, D.; P. Adhikari; J. A. Shin; J. H. Lee; Y. J. Kim; X. M. Zhu; J. N. Hu; J. Jin; C. C. Akoh y K. T. Lee (2010). *Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats*. LWT - Food Science and Technology. 43(3):458-464.
- Miller, D. A.; J. M. Prausnitz y H. W. Blanch (1991). *Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclohexane*. Enzyme and Microbial Technology. 13(2):98-103.
- Neff, W. E.; G. R. List y W. C. Byrdwell (1999). *Effect of Triacylglycerol Composition on Functionality of Margarine Basestocks*. LWT - Food Science and Technology. 32(7):416-424.
- Osborn, H. T. y C. C. Akoh (2002). *Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 1(3):110-120.
- Palla, C. A.; C. Pacheco y M. E. Carrín (2012). *Production of structured lipids by acidolysis with immobilized Rhizomucor miehei lipases: Selection of suitable reaction conditions*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 76:106-115.
- Ribeiro, A.; R. Basso; R. Grimaldi; L. Gioielli y L. Gonçalves (2009). *Instrumental Methods for the Evaluation of Interesterified Fats*. Food Analytical Methods. 2(4):282-302.
- Ronne, T. H.; T. Yang; H. Mu; C. Jacobsen y X. Xu (2005). *Enzymatic Interesterification of Butterfat with Rapeseed Oil in a Continuous Packed Bed Reactor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(14):5617-5624.
- Sellappan, S. y C. C. Akoh (2002). *Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids in polar solvents*. Journal of Food Lipids. 9(3):239-246.
- Serdarevich, B. (1967). *Glyceride isomerizations in lipid chemistry*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 44(7):381-393.
- Silva, R. C.; L. N. Cotting; T. P. Poltronieri; V. M. Balcão; D. B. de Almeida; L. A. G. Gonçalves; R. Grimaldi y L. A. Gioielli (2009). *The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil*. LWT - Food Science and Technology. 42(7):1275-1282.
- Zhang, H.; X. Xu; J. Nilsson; H. Mu; J. Adler-Nissen y C.-E. Høy (2001). *Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated*

*Thermomyces lanuginosa* lipase in a large-scale study. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(1):57-64.

# 5. DISTRIBUCIÓN POSICIONAL DE LOS RESIDUOS ACILO EN LOS GLICÉRIDOS

---



## 5.1. INTRODUCCIÓN

La posición en la cual se encuentran esterificados los ácidos grasos en la molécula de triglicérido juega un papel crucial, tanto en la funcionalidad de los productos grasos como en la forma en que dichos residuos acilo se metabolizan al ser ingeridos. En el caso de la manteca de cerdo por ejemplo, la presencia de ácido palmítico en la posición *sn*-2 contribuye a aumentar la friabilidad en las masas de tarta (Hunter, 2001). Puede citarse también el típico caso de la manteca de cacao; la distribución única de los ácidos palmítico, oleico y esteárico en los triglicéridos predominantes en dicho producto es la responsable del estrecho rango de punto de fusión de la misma, el cual se ubica justo por debajo de la temperatura corporal. Precisamente la manera en que la manteca de cacao funde en la boca es una de las razones por las cuales el consumo de chocolate resulta tan placentero (Hunter, 2001). En cuanto a sus implicancias nutricionales, éstas se encuentran relacionadas con la acción de la lipasa pancreática, cuya acción en el organismo consiste en hidrolizar los ácidos grasos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 durante el proceso de digestión de los triglicéridos (Ray y Bhattacharyya, 1995). El destino metabólico de los ácidos grasos retenidos en la posición *sn*-2, el cual depende del largo de la cadena carbonada de los mismos, es diferente al de los ácidos grasos liberados. Los aceites y grasas naturales de origen vegetal son ricos en ácidos grasos insaturados (principalmente esenciales) en la posición central del glicerol, mientras que los saturados se ubican generalmente en las posiciones externas del mismo (Ray y Bhattacharyya, 1995; Ribeiro et al., 2009).

En el caso de la interesterificación enzimática orientada a la obtención de productos grasos con propiedades funcionales mejoradas utilizando lipasas *sn*-1,3 específicas, la elección de este tipo de enzimas se basa principalmente en la intención de mantener inalterado el perfil ácido de la posición *sn*-2 de los sustratos naturales. Diversos trabajos indican que las lipasas utilizadas en la presente tesis pueden considerarse estrictas respecto a su acción exclusiva sobre las posiciones *sn*-1 y -3 del glicerol (Ferrari et al., 1997; Du et al., 2005; Rodriguez et al., 2008; Wang et al., 2008; Fernandez-Lafuente, 2010).

Este objetivo, así como también el rendimiento de la reacción, puede verse amenazado por un mecanismo no enzimático conocido como *acil migración*. En las reacciones de interesterificación este fenómeno espontáneo se presenta debido a la aparición de glicéridos parciales, especialmente diglicéridos (Xu et al., 1998). La acil migración en este grupo de glicéridos consiste en la isomerización de los 1(3),2-DAG, generados por las lipasas *sn*-1,3 específicas, a la forma termodinámicamente más estable de 1,3-DAG. La fuerza impulsora principal para esta reacción radica en un efecto estérico. El grupo éster en la posición *sn*-2 del 1(3),2-DAG presenta mayores interacciones con el grupo éster adyacente en posición *sn*-1(3) y con el hidroxilo en posición *sn*-3(1) que los correspondientes al 1,3-DAG. Por otro lado, este efecto es parcialmente contrarrestado por la atracción entre las cadenas de ácidos grasos no polares debido a fuerzas de tipo van der Waals (Serdarevich, 1967). La relación de equilibrio 1(3),2-DAG:1,3-DAG depende del grado de insaturación de los grupos acilo, así como también del largo de sus cadenas carbonadas (Serdarevich, 1967; Laszlo et al., 2008). Para el caso de DAG de cadena larga se han reportado valores de porcentaje de 1,3-DAG respecto al total de DAG de 56% para la acil migración en 1,2-dipalmitina (Kodali et al., 1990); sin embargo el rango generalmente aceptado es de 60 - 70% (Freeman y Morton, 1966; Serdarevich, 1967; Xu et al., 1998; Laszlo et al., 2008). Para los MAG, esta relación aumenta considerablemente siendo de aproximadamente 1:9 (2-MAG:1(3)-MAG) debido a la ausencia de compensación del efecto estérico por parte de las fuerzas de van der Waals mencionadas (Boswinkel et al., 1996; Compton et al., 2007).

La reducción en el rendimiento de la reacción como consecuencia de la acil migración de DAG se produce debido a que la enzima *sn*-1,3 específica no es capaz de reesterificar un grupo acilo en la posición *sn*-2, aumentando en principio el contenido de 1,3-DAG en el medio de reacción.

Existen diversos factores que pueden afectar la acil migración. La presencia de ácidos o bases en el medio catalizarían la reacción (Xu et al., 1998; Laszlo et al., 2008). En el caso de las reacciones de interesterificación, los ácidos grasos podrían ejercer este efecto; sin embargo, al tratarse de ácidos débiles su efecto sería mínimo (Xu et al., 1998). Por otro lado, existen estudios contradictorios con respecto al efecto del agua.

Oda et al. (2005) y Kaieda et al. (1999) encontraron que el contenido de agua aceleraba la acil migración en reacciones de metanólisis de aceites vegetales. Sin embargo, Xu et al. (1998) aseguran que, en medios libres de solvente, el agua no induce la migración; alegando que los efectos reportados por otros autores probablemente se deban a diferentes niveles de DAG generados a diferentes contenidos de agua. Existe controversia también respecto al rol del solvente en la acil migración. Xu et al. (1998) indicaron que los solventes no polares aceleraban la migración, referenciando un trabajo de Goh et al. (1993) en el que se analizó el efecto del agregado de dos solventes no polares, hexano y dietil éter, en la transesterificación de manteca de cacao. Estos últimos autores concluyeron que la presencia de hexano en el medio de reacción produjo un aumento significativo del fenómeno de acil migración. Sin embargo, dicha conclusión surgió de la comparación de ambos sistemas, sin reportar datos respecto al comportamiento que tendrían los mismos en medios libres de solvente. Más aún, en un trabajo posterior de Xu (Yang et al., 2005) se arriba a la conclusión que el hexano podría inhibir la acil migración en reacciones de acidólisis de tripalmitina con ácido linoleico conjugado (CLA) y ácido cáprico.

A diferencia de los posibles efectos de los contenidos de agua y solvente en el medio, se encuentra fuera de discusión la acción aceleradora de la acil migración que poseen ciertos soportes sobre los cuales se realiza la inmovilización de las enzimas, o incluso sales que se adicionan a los mismos (Kodali et al., 1990; Sjursnes et al., 1995; Du et al., 2005). Debido al origen termodinámico del proceso de isomerización, la temperatura posee una gran influencia sobre las velocidades de migración (Yang et al., 2005). Por último, se sabe que la velocidad de isomerización y la relación de equilibrio 1(3),2-DAG:1,3-DAG dependen del tamaño y naturaleza de los ácidos grasos involucrados en el proceso (Serdarevich, 1967; Boswinkel et al., 1996; Laszlo et al., 2008).

La presente sección comienza con un estudio de la distribución de los triglicéridos (TAG) en los productos de reacción en el equilibrio, así como también del perfil ácido en la posición *sn*-2 de los mismos. Se comenzó realizando predicciones a partir de consideraciones teóricas, para luego comparar las mismas con los datos experimentales obtenidos con diferentes relaciones de sustratos y tipos de enzima.

Luego, se llevó a cabo un estudio de la ocurrencia del fenómeno de acil migración en la reacción de interesterificación en estudio considerando al porcentaje molar de 1,3-DAG respecto al total de DAG como indicador del grado de acil migración alcanzado en los diferentes productos. Se evaluó en particular el efecto del tipo y concentración de enzima, grado de insaturación de los residuos acilo de las mezclas reactivas, presencia de hexano en el medio de reacción e influencia de la temperatura en estos últimos sistemas.

## 5.2. ESTUDIO DEL PERFIL DE TAG Y RESIDUOS ACILO EN LA POSICIÓN *sn*-2

Como se mencionó previamente, el patrón acídico de la posición *sn*-2 de los glicéridos constituyentes de los productos grasos posee importantes implicancias nutricionales, motivo por el cual se intenta mantener lo más inalterado posible respecto al de los sustratos naturales.

En la presente sección se estudia, de forma teórica y experimental, el efecto de la reacción de interesterificación sobre la distribución de los TAG y ácidos grasos en la posición *sn*-2 del glicerol en los productos finales.

### 5.2.1. SUSTRATOS

A continuación se presentan las distribuciones de los residuos acilo, clasificados según estos sean saturados o insaturados, en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1,3 en las mezclas de reacción utilizadas (Tabla 5.1.).

**Tabla 5.1.** Distribución global y posicional de los ácidos grasos correspondientes a las mezclas reactivas iniciales (% mol/mol).

		Relación de sustratos SO:FHSO (m/m)			
		50:50	60:40	65:35	70:30
Global <sup>A</sup>	%S	58.44 ± 0.01	50.53 ± 0.01	46.57 ± 0.02	42.62 ± 0.02
	%U	41.56 ± 0.01	49.47 ± 0.01	53.43 ± 0.02	57.38 ± 0.02
Posición <i>sn</i> -2	%S <sub>2</sub>	50.30 ± 3.37	41.00 ± 1.77	36.35 ± 2.86	31.70 ± 0.98
	%U <sub>2</sub>	49.70 ± 3.06	59.00 ± 1.11	63.65 ± 1.25	68.30 ± 1.12
	$\left(\frac{\%U_2}{\%S_2}\right)$	0.99 ± 0.10	1.44 ± 0.11	1.75 ± 0.24	2.15 ± 0.14
Posición <i>sn</i> -1,3	%S <sub>1,3</sub>	62.51 ± 3.37	55.30 ± 1.77	51.69 ± 2.86	48.08 ± 0.98
	%U <sub>1,3</sub>	37.49 ± 3.06	44.70 ± 1.11	48.31 ± 1.25	51.92 ± 1.12

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

<sup>A</sup>porcentajes calculados teóricamente a partir de la composición de los sustratos.

### 5.2.2. PREDICCIÓN DE PERFILES DE TAG Y RELACIÓN (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) EN PRODUCTOS INTERESTERIFICADOS

La interesterificación química produce un reacomodamiento *totalmente al azar* de los residuos acilo en la mezcla de TAG reaccionante, considerando que todos los ácidos grasos presentan la misma reactividad. Por lo tanto, a partir de las composiciones acídicas de los sustratos, y aplicando conceptos básicos de probabilidad, es posible predecir el patrón de TAG que se obtendrá al alcanzar la mezcla reactante el equilibrio. Para el caso en que se consideren únicamente dos tipos de ácidos grasos involucrados, saturados (S) e insaturados (U), la aplicación de las Ec. (5-1) a (5-4) provee la distribución de triglicéridos mencionada (Hustedt, 1976). Los porcentajes de ácidos grasos presentados en dichas ecuaciones (%S y %U) corresponden a la proporción de cada una de las clases de ácidos grasos presente en la mezcla inicial de reacción.

$$\%SSS = \frac{(\%S)(\%S)(\%S)}{10000} \quad (5-1)$$

$$\%SUS = 3 \frac{(\%S)(\%U)(\%S)}{10000} \quad (5-2)$$

$$\%UUS = 3 \frac{(\%U)(\%U)(\%S)}{10000} \quad (5-3)$$

$$\%UUU = \frac{(\%U)(\%U)(\%U)}{10000} \quad (5-4)$$

El reacomodamiento totalmente aleatorio de los grupos acilo genera iguales proporciones de isómeros de posición de los triglicéridos mixtos (constituidos por ácidos grasos de diferente tipo), lo cual se ve reflejado en las Ec. (5-2) y (5-3).

Realizando un análisis análogo, la distribución de los TAG considerando un reacomodamiento al azar de los residuos acilo correspondientes a las posiciones  $sn-1$  y  $sn-3$ , manteniendo invariables las posiciones  $sn-2$ , vendría dada por las Ec. (5-5) a (5-12). En este caso es necesario realizar una discriminación entre las proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados esterificados en las posiciones  $sn-2$  ( $S_2$  y  $U_2$ ) o  $sn-1,3$  ( $S_{1,3}$  y  $U_{1,3}$ ).

$$\%SSS = \frac{(\%S_{1,3})(\%S_2)(\%S_{1,3})}{10000} \quad (5-5)$$

$$\%USS = \frac{(\%U_{1,3})(\%S_2)(\%S_{1,3})}{10000} \quad (5-6)$$

$$\%SUS = \frac{(\%S_{1,3})(\%U_2)(\%S_{1,3})}{10000} \quad (5-7)$$

$$\%SSU = \frac{(\%S_{1,3})(\%S_2)(\%U_{1,3})}{10000} \quad (5-8)$$

$$\%UUS = \frac{(\%U_{1,3})(\%U_2)(\%S_{1,3})}{10000} \quad (5-9)$$

$$\%USU = \frac{(\%U_{1,3})(\%S_2)(\%U_{1,3})}{10000} \quad (5-10)$$

$$\%SUU = \frac{(\%S_{1,3})(\%U_2)(\%U_{1,3})}{10000} \quad (5-11)$$

$$\%UUU = \frac{(\%U_{1,3})(\%U_2)(\%U_{1,3})}{10000} \quad (5-12)$$

A diferencia de la distribución final de TAG mixtos (SUS y UUS) predicha para un proceso de redistribución totalmente aleatorio, en el caso de la distribución *sn*-1,3 al azar no se obtienen iguales proporciones de los mismos. En las Tablas 5.2. y 5.3. se muestran las distribuciones de TAG esperadas según uno u otro tipo de reacomodamiento de los residuos acilo en la estructura del glicerol.

**Tabla 5.2.** Distribución teórica de TAG (% mol/mol) y relación (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) en posición *sn*-2 calculadas suponiendo aleatorización total de los residuos acilo para diferentes mezclas reactivas iniciales.

SO:FHSO (m/m)	%SSS	%SUS	%SSU + %USS	%USU	%UUS + %SUU	%UUU	$\left(\frac{\%U_2}{\%S_2}\right)$
50:50	19.96	$\frac{14.19}{42.58}$	28.39	$\frac{10.09}{30.28}$	20.19	7.18	0.53
60:40	12.90	$\frac{12.63}{37.89}$	25.26	$\frac{12.57}{37.70}$	25.13	12.11	0.66
65:35	10.10	$\frac{11.59}{34.77}$	23.18	$\frac{13.29}{39.88}$	26.59	15.25	0.73
70:30	7.74	$\frac{10.42}{31.27}$	20.85	$\frac{14.03}{42.10}$	28.07	18.89	0.81
80:20 <sup>A</sup>	4.18	$\frac{7.86}{23.59}$	15.73	$\frac{14.80}{44.39}$	29.59	27.84	1.02

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

<sup>A</sup>Calculada teóricamente a partir de las composiciones de los sustratos.

**Tabla 5.3.** Distribución teórica de TAG (% mol/mol) y relación (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) en posición *sn*-2 calculadas suponiendo aleatorización total de los residuos acilo en las posiciones *sn*-1,3, manteniendo intactos los esterificados en las posiciones *sn*-2.

SO:FHSO (m/m)	%SSS	%SUS	%SSU + %USS	%USU	%UUS + %SUU	%UUU	$\left(\frac{\%U_2}{\%S_2}\right)$
50:50	19.66	19.42	23.57	7.07	23.30	6.98	0.99
		43.00			30.36		
60:40	12.54	18.04	20.27	8.19	29.17	11.79	1.44
		38.31			37.36		
65:35	9.71	17.01	18.15	8.48	31.79	14.86	1.75
		35.16			40.27		
70:30	7.33	15.79	15.82	8.54	34.10	18.41	2.15
		31.61			42.65		
80:20	3.74	12.96	10.82	7.83	37.51	27.14	3.47
		23.78			45.34		

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

Analizando los valores de distribución de TAG obtenidos en las Tablas 5.2. y 5.3. puede notarse que las proporciones de los diferentes isómeros de posición de los TAG mixtos según el tipo de redistribución de los residuos acilo pueden llegar a diferir considerablemente. Sin embargo, si no se tiene en cuenta la discriminación realizada por isomería de posición, la distribución de los TAG en ambos casos es muy similar. No ocurre lo mismo con la relación (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>). Ésta varía considerablemente según se proponga un mecanismo de redistribución de los residuos acilo u otro.

### 5.2.3. PERFILES EXPERIMENTALES DE TAG Y RELACIÓN (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) EN PRODUCTOS INTERESTERIFICADOS

En la Tabla 5.4. se muestran los resultados obtenidos para el perfil de TAG en el equilibrio (después de 48 horas de reacción) para muestras interesterificadas con diferentes relaciones de sustratos iniciales y catalizadas por ambas enzimas.



**Tabla 5.4.** Perfil de TAG en el equilibrio para muestras interesterificadas (% mol/mol).

SO:FHSO (m/m)	Tipo de Enzima	%SSS	%SUS + %SSU + %USS	%USU +%UUS + %SUU	%UUU	$\left(\frac{\%U_2}{\%S_2}\right)$
50:50	RM IM	22.84 ± 0.43	40.80 ± 1.63	26.56 ± 0.92	9.79 ± 0.28	0.69 ± 0.05
	TL IM	18.38 ± 1.25	42.88 ± 0.95	29.17 ± 0.36	9.56 ± 2.56	0.58 ± 0.03
60:40	RM IM	16.53 ± 0.79	37.07 ± 1.07	33.23 ± 1.31	13.18 ± 1.60	1.14 ± 0.11
65:35	TL IM	11.94 ± 1.00	34.85 ± 0.68	36.88 ± 0.38	16.33 ± 1.29	0.96 ± 0.05
70:30	RM IM	8.31 ± 0.11	30.67 ± 0.42	40.90 ± 0.55	20.12 ± 1.08	1.13 ± 0.07

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

Condiciones de reacción: 70°C, 230 rpm, valores para 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima.

Comparando los resultados obtenidos para las muestras interesterificadas enzimáticamente con la distribución de TAG predicha para un reordenamiento al azar de los residuos acilo de las posiciones *sn*-1,3 sin modificación de los ubicados en la posición *sn*-2 (Tabla 5.3.), es posible notar que ambas distribuciones resultaron ser diferentes. En principio, podrían plantearse dos posibles hipótesis. Por un lado, las distribuciones teóricas de TAG presentadas en las Tablas 5.2. y 5.3. fueron derivadas con la condición implícita de que únicamente dichas especies se encontrarían presentes en el sistema. Si se considera que un cierto porcentaje de los productos de interesterificación está representado por glicéridos parciales (MAG y DAG) y ácidos grasos libres (FFA), las concentraciones de equilibrio obtenidas seguramente se modificarían. Por otro lado, la suposición de especificidad *sn*-1,3 por parte de las lipasas utilizadas no garantiza que los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn*-2 no sean factibles de ser redistribuidos. Esto podría ocurrir como consecuencia de la acil migración. Si éste fuera el caso, la condición de inalterabilidad del perfil ácido en posición *sn*-2 utilizada para la predicción de la distribución de los diferentes grupos de TAG no sería totalmente válida, generando un perfil teórico alejado del real.

Por otra parte, a modo comparativo, en la Tabla 5.5. se presentan los patrones de TAG de dos productos comerciales analizados, uno interesterificado químicamente y otro mediante catálisis enzimática. La muestra correspondiente al producto tratado químicamente fue provista por la firma Calsa S.A., empresa que también proveyó el

FHSO para la obtención de los productos de la presente tesis, y reportada como una mezcla interesterificada de SO y FHSO con una relación de sustratos inicial en el rango de 70:30 a 80:20 (% m/m). Comparando su perfil de TAG con los predichos para una distribución totalmente al azar (Tabla 5.2.) se podría estimar una relación más cercana a 70:30. De la misma manera que ocurre con las muestras enzimáticamente interesterificadas, y en este caso aún en forma más marcada, las proporciones reales difieren de las predichas, especialmente para los SSS y UUS. Las hipótesis planteadas previamente para explicar este fenómeno en los productos obtenidos mediante catálisis enzimática podrían también aplicarse en este caso. Incluso éstas podrían tomar más fuerza si se considera el efecto de las condiciones de reacción más extremas bajo las cuales se lleva a cabo la interesterificación química.

En cuanto a la muestra interesterificada enzimáticamente, ésta corresponde a un producto comercial (Vegetalina) elaborado por la firma Flora Dánica SAIC y se adquirió en un mercado local. Se intentó recabar información respecto a las características de los sustratos de la reacción y su relación másica inicial; sin embargo, la empresa elaboradora se reservó dicha información debido a que el proceso a escala industrial resulta aún novedoso. Se encuentra disponible cierta información respecto al proceso (Biotimes, [http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006\\_ES.pdf](http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006_ES.pdf)), por lo que se conoce que la reacción se llevó a cabo en forma continua a 70°C con Lipozyme TL IM. En cuanto a la relación de sustratos, desconociendo el origen y características de los mismos, resultaría demasiado arriesgado proponer algún valor comparando con los patrones de TAG reportados en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.5.** Perfil de TAG para dos productos comerciales.

Producto	%SSS	%SUS + %SSU + % USS	%USU +%UUS + %SUU	%UUU
Mezcla SO:FHSO químicamente interesterificada <sup>A</sup>	8.50 ± 0.53	28.46 ± 1.13	40.65 ± 0.63	22.38 ± 2.29
Mezcla enzimáticamente interesterificada con Lipozyme TL IM <sup>B</sup>	12.74 ± 0.62	30.69 ± 1.20	37.43 ± 0.51	19.13 ± 0.84

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.

<sup>A</sup> producto provisto por la empresa Calsa SA.

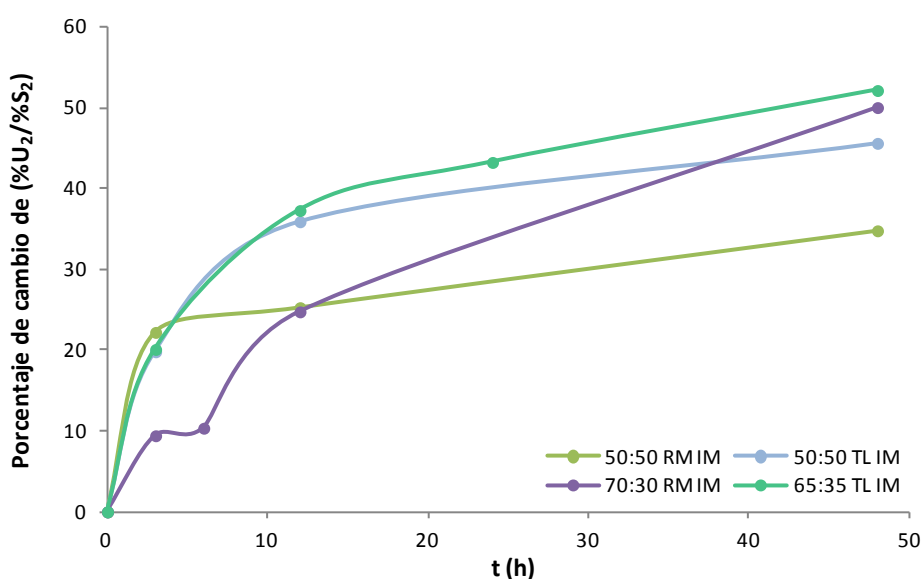
<sup>B</sup> muestra del producto Vegetalina, marca Flora Dánica SAIC.

Como se mencionó anteriormente, la comparación de las composiciones en TAG sin una discriminación por isomería de posición difícilmente permita realizar suposiciones respecto al patrón de distribución de residuos acilo generado durante el procesamiento de la muestra analizada. Se presentan mayores diferencias cuando se consideran diferentes relaciones de sustratos para un mismo patrón de distribución que al comparar ambos tipos de patrones.

Sin embargo, el análisis de las relaciones de ( $\%U_2/\%S_2$ ) en los productos obtenidos podría proveer mayor información al respecto. En este sentido se puede observar que los valores para los productos obtenidos en la presente tesis se encuentran entre los mínimos y máximos que podrían tomar, dados por los presentados en la Tabla 5.4. y 5.5., respectivamente. Zhang et al. (2001) encontraron un comportamiento similar al interesterificar química y enzimáticamente una mezcla 75:25 (% m/m) de estearina de palma y aceite de coco con Lipozyme TL IM. Las relaciones ( $\%U_2/\%S_2$ ) que obtuvieron fueron de 1.02, 0.33 y 0.69 para las mezclas iniciales y los productos de interesterificación química y enzimática, respectivamente.

Respecto a la hipótesis planteada sobre la ocurrencia del fenómeno de acil migración para explicar las desviaciones de los perfiles de TAG experimentales respecto a los teóricos, éste sin duda debería tener lugar en el sistema de reacción para modificar el cociente ( $\%U_2/\%S_2$ ).

En virtud de estos resultados, se extendió el análisis de composición de la posición *sn*-2 de los glicéridos a productos obtenidos en distintas condiciones y a otros tiempos de reacción. Las relaciones (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) se normalizaron calculando el porcentaje de cambio obtenido en los productos respecto a la relación inicial de sustratos, de manera de poder comparar el comportamiento del sistema a distintas relaciones SO:FHSO. En la Figura 5.1. se puede apreciar que con Lipozyme RM IM la velocidad de cambio inicial en la relación (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) estaría más favorecida para las mezclas con igual proporción de sustratos (50:50) en comparación con la mezcla más rica en aceite (70:30). Este comportamiento se revierte con el transcurrir del tiempo de reacción. Este resultado podría ser fruto de la acción conjunta de la reacción enzimática y la química ya que la lipasa podría mostrar preferencia por algún tipo de ácido graso, o éstos podrían poseer velocidades de migración diferenciales, o podría darse el efecto conjunto de ambos fenómenos. Por otro lado, se observa que con Lipozyme TL IM se obtuvieron productos más parecidos entre sí cuando se utilizaron distintas relaciones iniciales de sustratos.



**Figura 5.1.** Evolución del porcentaje de cambio de (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) en muestras interesterificadas con 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima y 70°C.

En general, puede observarse que con ambos biocatalizadores la velocidad de cambio inicial es máxima, lográndose luego de un cierto tiempo una velocidad prácticamente constante hasta el último tiempo analizado, considerado de equilibrio

para el sistema general de reacción. La velocidad inicial de cambio es similar para ambos biocatalizadores en la relación 50:50 de SO:FHSO, pero con Lipozyme RM IM se observa una reducción más abrupta en la velocidad de cambio. De esta manera, si bien a las 12 h de reacción las velocidades para ambas lipasas parecen nuevamente igualarse, los cambios obtenidos en los productos difieren sustancialmente.

A los efectos de evaluar el efecto que tendría la carga enzimática sobre la composición *sn*-2 de los glicéridos, se analizó también dicha composición para un producto obtenido luego de 48 h de reacción con 10% de Lipozyme RM IM partiendo de una relación SO:FHSO 50:50. Se encontró que el porcentaje de cambio de la relación (%U<sub>2</sub>/%S<sub>2</sub>) para el mismo fue de 42.0%, a diferencia del 35.8% representado en la Figura 5.1. para el producto obtenido en similares condiciones pero con 5% de Lipozyme RM IM en el medio de reacción.

## 5.3. ESTUDIO DE ACIL MIGRACIÓN

### 5.3.1. SUSTRATOS

En la Tabla 5.6. se presentan las composiciones en DAG del aceite de soja refinado (SO) y del aceite de soja totalmente hidrogenado (FHSO), así como también las correspondientes a las mezclas a partir de las cuales se realizaron las reacciones para llevar a cabo el estudio presentado en la presente sección.

La técnica cromatográfica implementada para el análisis de los productos de la reacción (apartado 2.2.8.2.) no permite cuantificar de manera independiente el contenido de 1,3-diestearina (1,3-StSt) y 1(3),2-dioleína (1(3),2-OO) ya que los tiempos de retención de ambos compuestos resultan tan cercanos que los respectivos picos cromatográficos se solapan completamente. Para el caso del aceite refinado, se resolvió asignar la totalidad del área de dicho pico a la 1(3),2-OO debido a la elevada relación O:St presente en dicho sustrato (aproximadamente 20.0:4.7, % m/m), mientras que para el aceite hidrogenado la elección fue opuesta utilizando un criterio análogo (relación O:St de aproximadamente 1.7:84.0, % m/m).

Si bien la concentración de ambos isómeros 1,3-DAG y 1(3),2-DAG en los sustratos es considerablemente baja (aproximadamente un 1% (mol/mol)) se puede observar que el porcentaje de 1,3-DAG correspondiente al aceite se encuentra en el rango de valores de equilibrio reportados para DAG con ácidos grasos de cadena larga (Freeman y Morton, 1966; Serdarevich, 1967; Xu et al., 1998; Laszlo et al., 2008). En el caso del aceite totalmente hidrogenado, el valor encontrado se encuentra levemente por encima de los mismos. Probablemente las condiciones térmicas extremas a las que se sometió el aceite durante el proceso de hidrogenación hayan desplazado el equilibrio hacia la formación de este isómero. Si bien posteriormente a dicho proceso el producto fue almacenado a temperatura ambiente, la limitada movilidad de sus moléculas debido a su carácter sólido probablemente haya generado que la relación de equilibrio alcanzada a la temperatura elevada se mantuviera inalterada.

**Tabla 5.6.** Composición en DAG de ambos sustratos y mezclas iniciales de reacción (SO:FHSO).

	SO	FHSO	Mezcla 50:50 (m/m)	Mezcla 80:20 (m/m)
1(3),2-DAG (mM)	0.44 ± 0.12	0.30 ± 0.03	0.37 ± 0.07	0.41 ± 0.10
1,3-DAG (mM)	0.67 ± 0.07	1.00 ± 0.09	0.83 ± 0.08	0.73 ± 0.08
% 1,3-DAG (mol/mol)	60.18 ± 3.59	76.63 ± 2.83	68.40 ± 3.21	63.45 ± 3.44

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

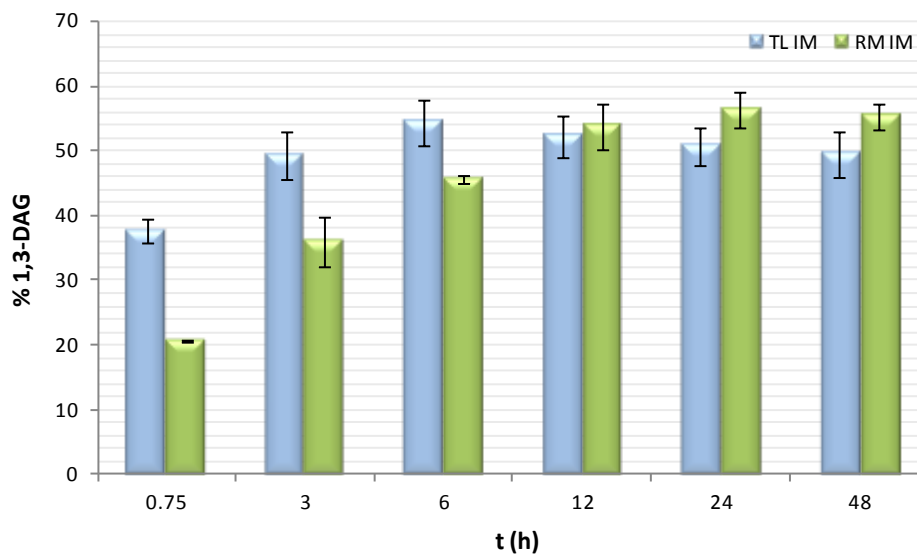
### 5.3.2. PRODUCTOS DE INTERESTERIFICACIÓN

De manera previa a cualquier análisis que se desee realizar, es necesario inspeccionar la influencia que posee el pico que resulta de la superposición de los correspondientes a 1,3-StSt y 1(3),2-OO. La concentración de estos compuestos en la fracción de DAG se encuentra en el rango 3.8 - 15.7% molar en los productos de reacción. Por lo tanto, se planteó evaluar las dos situaciones extremas que se pudieran presentar: adjudicar la totalidad del área del pico a 1,3-StSt, despreciando la cantidad de 1(3),2-OO que pudiera haber en la muestra, y viceversa. Por otro lado, considerando el contenido de ácido esteárico y oleico en los sustratos caracterizados en el Capítulo 2 (SO: 4.74 y 19.88% (m/m), FHSO: 83.8 y 1.25% (m/m) para St y O, respectivamente (despreciando el contenido de C18:1t en ambos casos)) y la relación

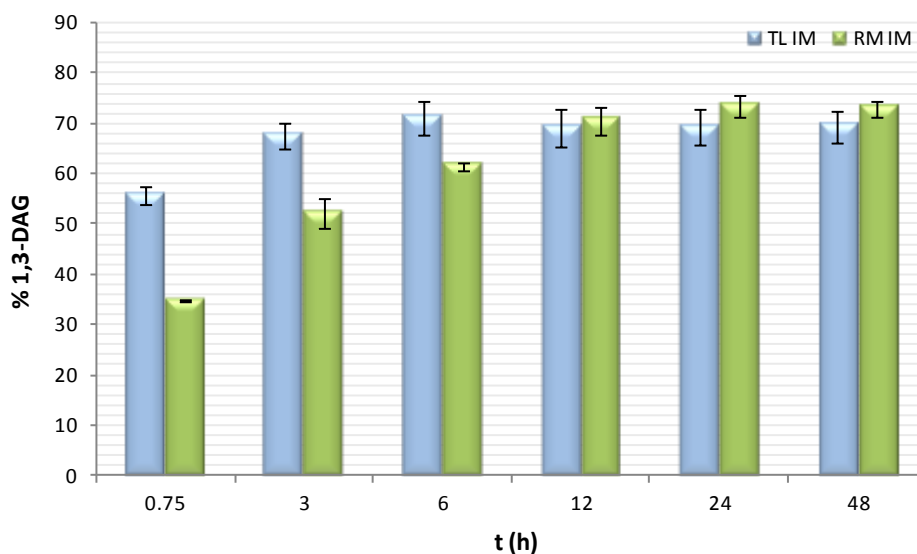
de los mismos presente en las mezclas reactivas analizadas (50:50 (m/m)), se obtiene una relación molar de aproximadamente 1:4 (O:St) en los glicéridos de la mezcla inicial. Esto permite inferir que la primera consideración, es decir despreciar la contribución de 1(3),2-OO, podría ser la más aproximada.

### 5.3.2.1. EFECTO DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

En las Figuras 5.2. y 5.3. se grafica la evolución de la proporción molar de 1,3-DAG respecto al total de DAG durante la interesterificación de mezclas con una relación másica SO:FHSO de 50:50 utilizando ambas enzimas en concentración de 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) y considerando formación despreciable de 1,3-StSt frente a 1(3),2-OO y viceversa.



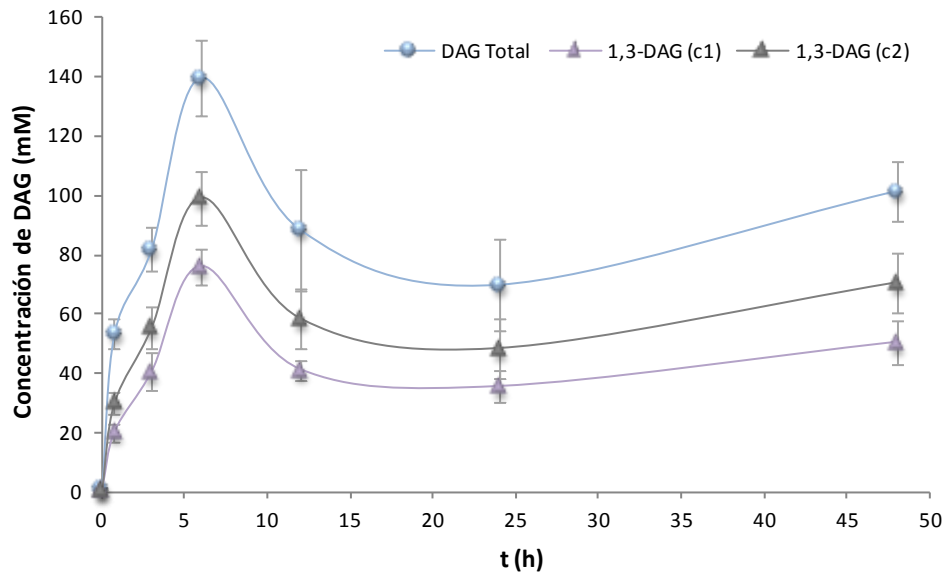
**Figura 5.2.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con una relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 (m/m), 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de enzima y 70°C, considerando formación despreciable de 1,3-StSt frente a 1(3),2-OO.



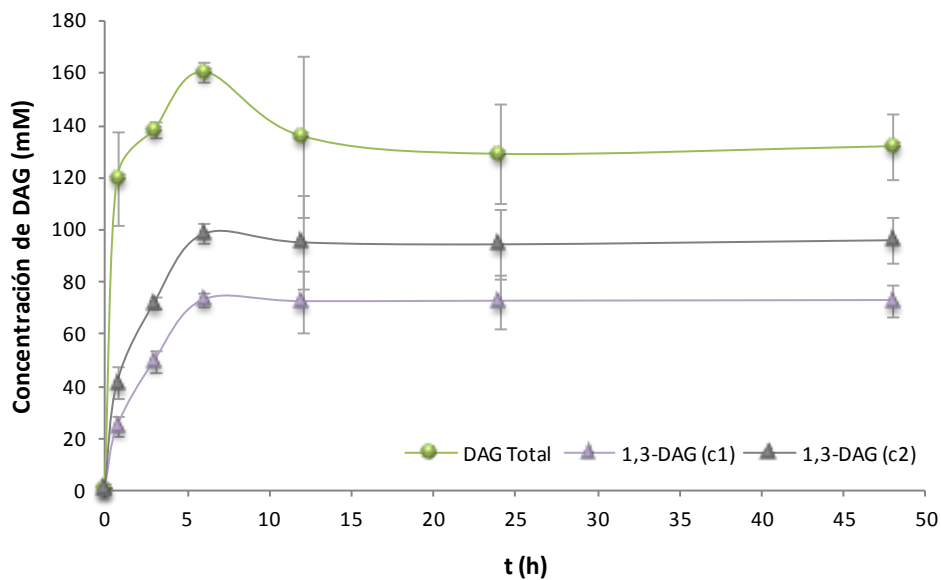
**Figura 5.3.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con una relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 (m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima y 70°C, considerando formación despreciable de 1(3),2-OO frente a 1,3-StSt.

Analizando los valores obtenidos en ambos casos para las muestras interesterificadas con Lipozyme TL IM, se observa que, alcanzadas las 3 h de reacción, el porcentaje de 1,3-DAG (y, por ende, el de 1(3),2-DAG) ya se encuentra estabilizado en su valor final, indicando que la reacción de isomerización de los grupos acilo alcanzó su condición de equilibrio. Esto no significa que la reacción global enzimática + química haya alcanzado el equilibrio, ya que, como puede apreciarse en la Figura 5.4., las composiciones de 1,3-DAG y DAG totales continúan modificándose con el transcurso del tiempo, pero lo hacen manteniendo la relación entre ellas. En cuanto a los valores alcanzados, éstos difieren dependiendo de la proporción 1,3-StSt:1(3),2-OO considerada en los productos. Para el caso de formación nula de 1,3-StSt, el porcentaje de equilibrio promedio alcanzado fue de 51.2%, mientras que para la situación opuesta, éste resultó ser de 68.7%. Es decir que el valor real se encontrará dentro de este rango, 51.2 - 68.7%.





(a)



(b)

**Figura 5.4.** Evolución en el tiempo de la concentración molar de DAG totales y 1,3-DAG considerando 2 criterios de identificación: (c1) formación despreciable de 1,3-StSt frente a 1(3),2-OO y (c2) formación despreciable de 1(3),2-OO frente a 1,3-StSt. (a) Lipozyme TL IM, (b) Lipozyme RM IM. Condiciones: SO:FHSO de 50:50 (m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima y 70°C.

En el caso de Lipozyme RM IM, recién a las 12 h de reacción se observa un nivel de 1,3-DAG estable, del orden de 55.1% y 72.3% para el caso considerado en la Figuras 5.2. y 5.3., respectivamente. En este caso, el equilibrio de la reacción de isomerización de DAG se alcanza en un tiempo similar al equilibrio global del sistema (Figura 5.4. (b)).

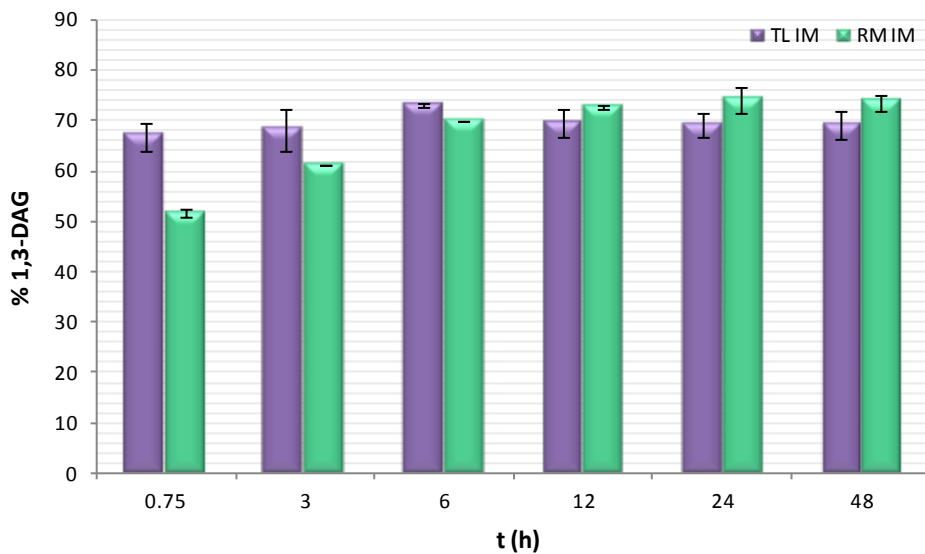
El hecho de que se hayan obtenido velocidades de acil migración (relativas respecto a la velocidad de formación de DAG totales), notablemente mayores con Lipozyme TL IM que con Lipozyme RM IM puede ser explicado en términos de los soportes de inmovilización correspondientes. Esta última se encuentra inmovilizada sobre una resina de intercambio iónico, mientras que el gel de sílice constituye el material de soporte para la primera. Si bien las resinas han sido reportadas como potenciales catalizadoras de la acil migración (Xu et al., 1998), existe aún mayor consenso respecto al alto poder acelerador de este fenómeno por parte del gel de sílice (Kodali et al., 1990; Goh et al., 1993; Du et al., 2005).

Comparando los valores de equilibrio obtenidos según la proporción de 1,3-StSt y 1(3),2-OO considerada en las muestras, los valores obtenidos para la suposición de ausencia de 1(3),2-OO se encontrarían más cercanos a aquellos mayormente reportados en la literatura, que están en el rango 60 - 70% (Freeman y Morton, 1966; Serdarevich, 1967; Xu et al., 1998; Laszlo et al., 2008). En consecuencia, teniendo en cuenta la relación molar St/O en los sustratos y, considerando además que ambos enfoques condujeron a las mismas conclusiones para la totalidad de las comparaciones realizadas en la presente sección, de aquí en adelante se mostrarán los resultados obtenidos considerando predominancia de 1,3-StSt frente a 1(3),2-OO en los productos de reacción.

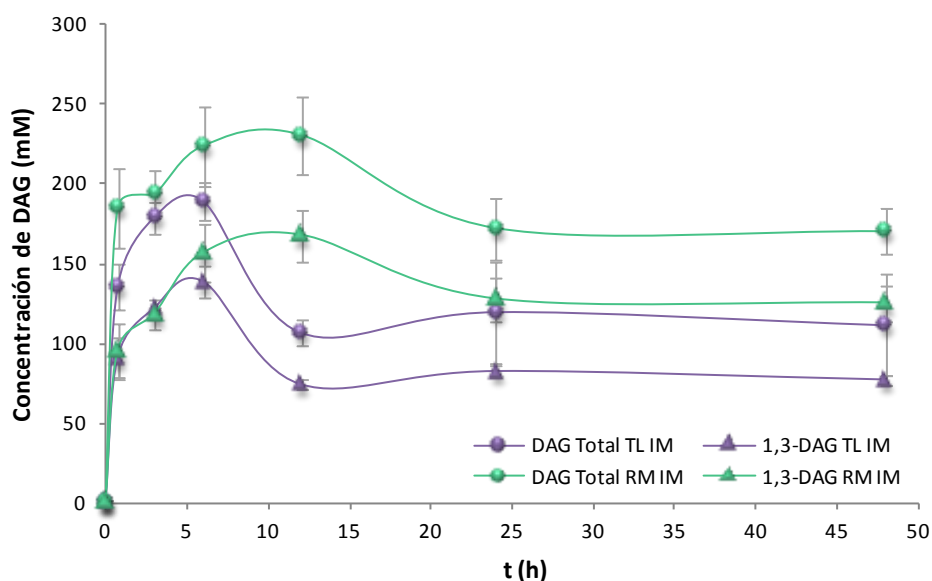
Para una concentración de 10% de enzima ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) en el medio, los resultados se presentan en las Figura 5.5. y 5.6., mientras que en la Figura 5.7. se grafican los resultados para ambas cargas y tipos de enzima, de manera de facilitar las comparaciones.

Puede observarse que para el caso de Lipozyme TL IM en una concentración de 10% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) ya a los 45 minutos de comenzada la reacción ambos isómeros de DAG se encontrarían en equilibrio entre sí, pero no así la reacción global (Figura 5.6.). Du et al. (2005) estudiaron el efecto del contenido de agua de dicho catalizador comercial sobre la velocidad de acil migración en DAG encontrando que éste no aceleraba dicha isomerización. Por lo tanto, el resultado obtenido aquí al aumentar la concentración de enzima de 5 a 10% reafirma el concepto de la importancia del efecto catalizador de la

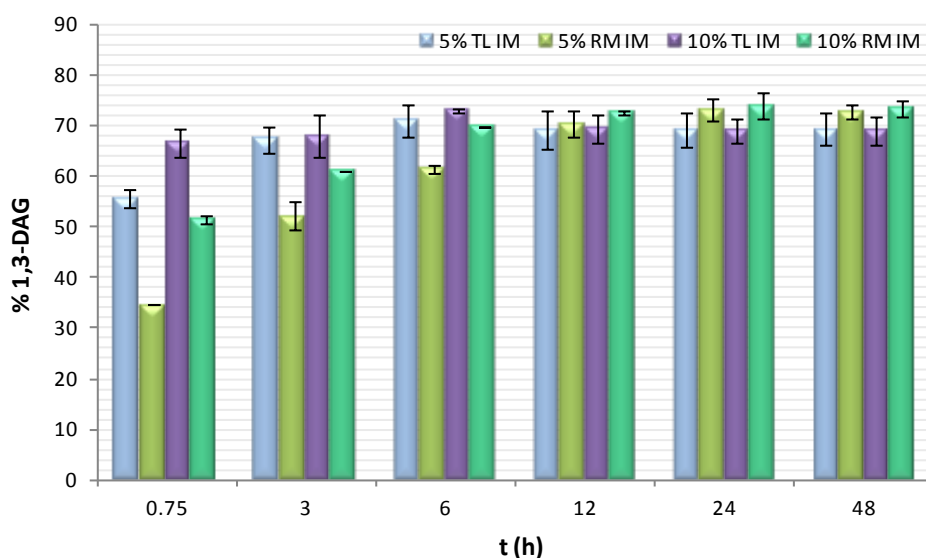
acil migración por parte del gel de sílice. En el caso del biocatalizador Lipozyme RM IM utilizado a una concentración de 10%, probablemente entre las 6 y 12 h de reacción se equilibren las concentraciones de los 1,3- y 1(3),2-DAG, alcanzando en dicha relación niveles comparables a los de Lipozyme TL IM. En este caso, si bien la velocidad relativa de migración aumenta respecto a la correspondiente a las muestras con la mitad de enzima, el efecto no resulta tan importante.



**Figura 5.5.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con una relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 (m/m), 10% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima y 70°C.



**Figura 5.6.** Evolución en el tiempo de la concentración molar de DAG totales y 1,3-DAG en muestras interesterificadas con una relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 (m/m), 10% (m/m<sub>sust.</sub>) de enzima y 70°C.



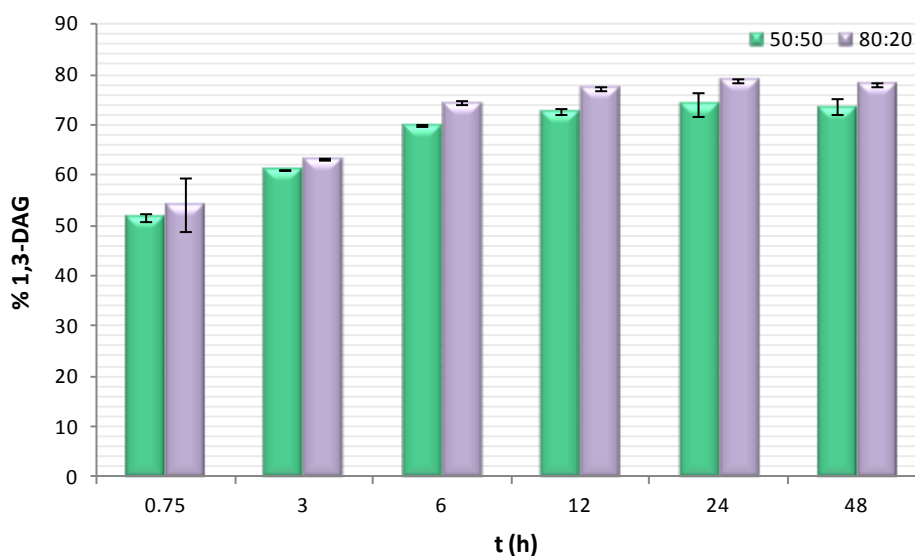
**Figura 5.7.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con una relación SO:FHSO de 50:50 (m/m) con diferentes concentraciones de enzima (m/m<sub>sust.</sub>), a 70°C.

Comparando los resultados de la Figura 5.4. con los de la Figura 5.6. puede observarse claramente que el incremento de la concentración de biocatalizador afecta directamente a la cinética global de reacción, ya sea por la elevación en la concentración total de DAG como en los isómeros 1,3-DAG. La aceleración impuesta

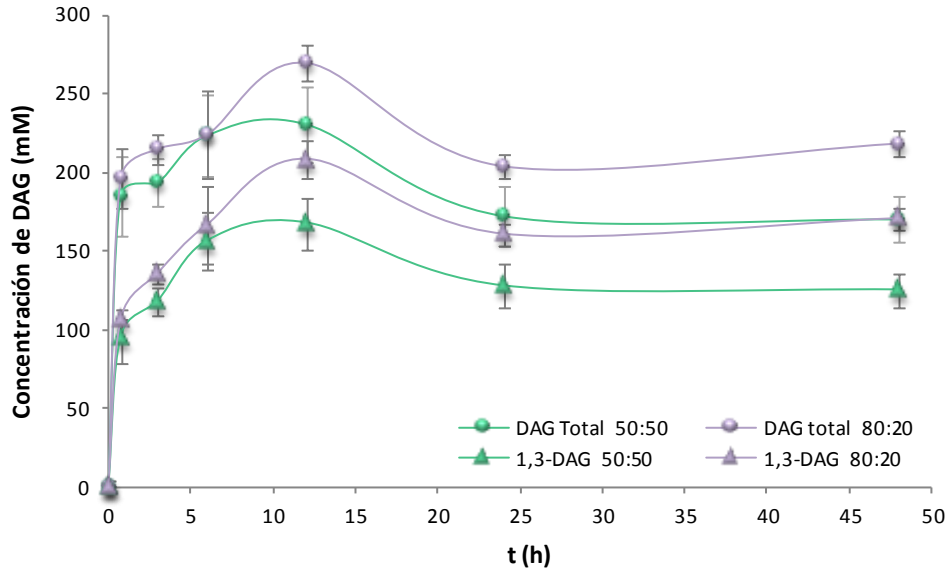
con el incremento de masa de biocatalizador genera la ampliación del rango de tiempos en que la producción de DAG y sus isómeros es máxima.

### 5.3.2.2. EFECTO DE LA RELACIÓN DE SUSTRATOS

Se analizaron las consecuencias de un cambio en la relación de sustratos de la mezcla de reacción sobre la acil migración en reacciones llevadas a cabo con Lipozyme RM IM y una concentración de enzima de 10%. Se analizaron muestras con relaciones SO:FHSO de 50:50 y 80:20, para las cuales los contenidos de ácidos grasos insaturados se ubicaron en 42.1 y 65.3% (mol/mol). Si bien la proporción de St respecto a O en estas últimas mezclas disminuyó de 79 a 54% (mol/mol) en relación a las primeras mezclas, la proporción de St continuó siendo superior a la de O. Además, el porcentaje de 1,3-DAG en los productos analizados rápidamente supera el correspondiente a 1(3),2-DAG (especialmente en los casos con 10% de enzima), por lo que se consideró aceptable continuar suponiendo concentración despreciable de 1(3),2-OO frente a 1,3-StSt. En las Figuras 5.8. y 5.9. se presentan los resultados obtenidos.



**Figura 5.8.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con 10% de Lipozyme RM IM y una relación SO:FHSO de 50:50 y 80:20 (m/m), a 70°C.



**Figura 5.9.** Evolución en el tiempo de la concentración molar de 1,3-DAG en muestras interesterificadas con 10% de Lipozyme RM IM y una relación SO:FHSO de 50:50 y 80:20 (m/m), a 70°C.

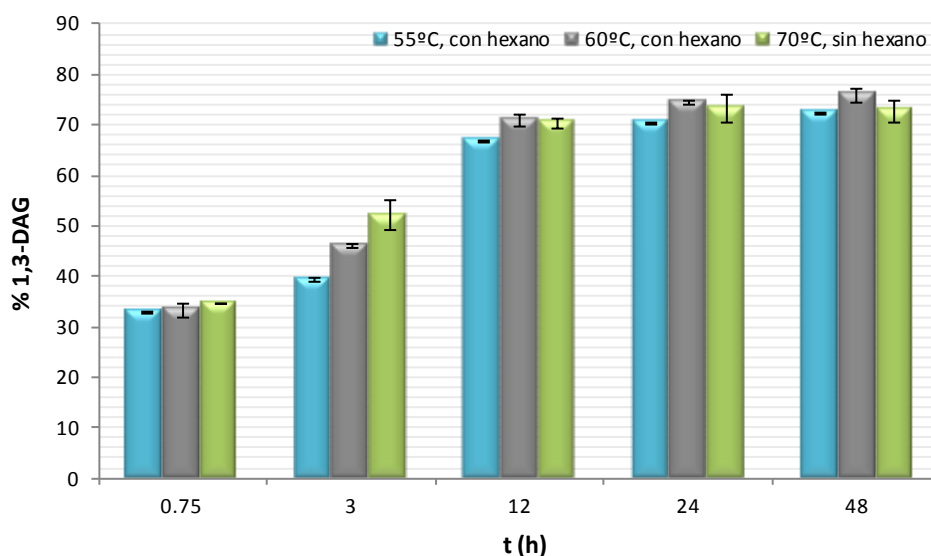
Para ambas relaciones de sustrato el equilibrio entre los isómeros de DAG ya se habría alcanzado para las 12 h de reacción (Figura 5.8.), aunque en el caso de la relación 50:50 el porcentaje de 1,3-DAG se estabiliza en valores menores ( $P < 0.03$ ). Inicialmente se observa que la producción de 1,3-DAG sería levemente inferior cuando se parte de una relación de sustratos 50:50 (Figura 5.9.). Para el caso de la relación 80:20 la concentración de 1,3-DAG aumenta en forma aproximadamente constante hasta las 12 h de reacción (tiempo en que se alcanza el equilibrio entre los isómeros de DAG), mientras que para las muestras con una relación 50:50 no se observa un incremento apreciable en la misma a partir de las 6 h. Por otro lado se observa que, para ambas relaciones de sustratos analizadas, el equilibrio global del sistema se alcanzaría en un tiempo comprendido entre las 12 y 24 h.

Mattson y Volpenhein (1962) estudiaron la isomerización de diferentes tipos de monoglicéridos (2-monooleína, 2-monopalmitina y 2-monoestearina) y demostraron que el grado de insaturación y el largo de cadena del residuo acilo influyen sobre la velocidad de isomerización, así como también sobre la relación de equilibrio; siendo considerablemente mayor el efecto del grado de insaturación que el de la longitud de

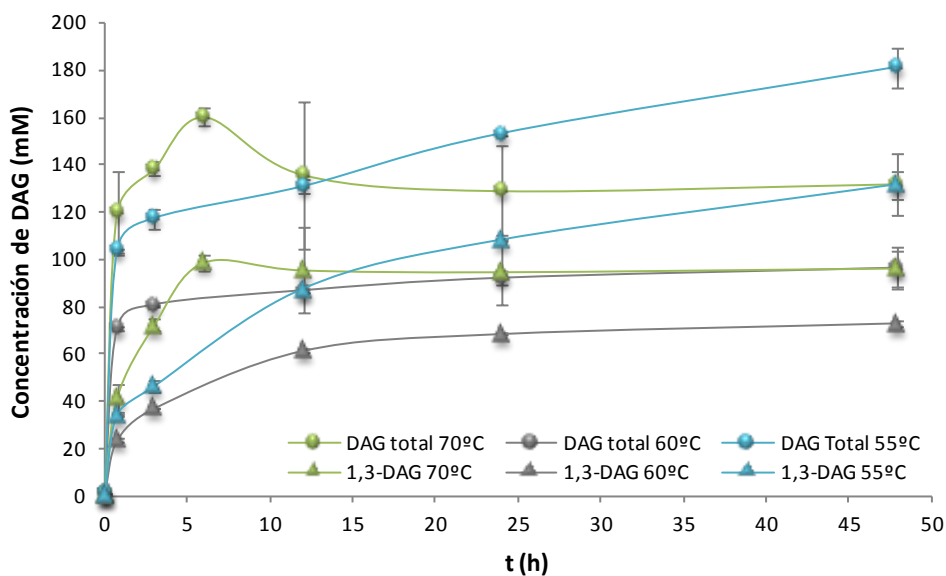
la cadena carbonada. Los resultados obtenidos aquí con respecto al nivel de insaturación concuerdan con dicha evidencia.

### 5.3.2.3. EFECTO DEL AGREGADO DE SOLVENTE Y DE LA TEMPERATURA

Por último, se propuso evaluar el efecto del agregado de hexano al medio de reacción sobre la cinética de la acil migración. Se analizaron los productos de la interesterificación a 55 y 60°C de mezclas con una relación másica SO:FHSO de 50:50 tratadas con 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM y el agregado de 3 mL/g<sub>sust.</sub> de hexano. En las Figuras 5.10 . y 5.11. se pueden observar los resultados obtenidos.



**Figura 5.10.** Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG en muestras interesterificadas con 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 (m/m), en ausencia y presencia de hexano a diferentes temperaturas.



**Figura 5.11.** Evolución en el tiempo de la concentración molar de DAG totales y 1,3-DAG en muestras interesterificadas con 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM, relación de sustratos (SO:FHSO) de 50:50 ( $m/m$ ), en ausencia y presencia de hexano a diferentes temperaturas.

Analizando los resultados obtenidos para las muestras interesterificadas en presencia de hexano a 55 y 60°C es posible apreciar que, si bien a menor temperatura se obtiene mayor concentración de DAG totales y de 1,3-DAG, las mismas no se elevan en igual proporción. Esto permite concluir que existiría un aumento en la velocidad relativa de isomerización con la temperatura, así como también se observa una leve disminución en el tiempo al cual se alcanza el equilibrio de isomerización. Como se mencionó anteriormente, la acil migración consiste en un proceso termodinámico, el cual se ve influenciado de manera significativa por la temperatura. Los resultados obtenidos aquí concuerdan con dicha afirmación.

Por otro lado, si se planteara realizar un análisis del efecto del hexano sobre el fenómeno en estudio, la comparación debería realizarse necesariamente sobre muestras interesterificadas a igual temperatura, de manera de anular el comprobado efecto que la misma posee. Como se explicara en el Capítulo 4 no fue posible realizar experiencias manteniendo dicha condición de reacción debido a limitaciones de propias del sistema. Por un lado, debido al elevado punto de fusión del FHSO utilizado, la mínima temperatura a la cual fue posible realizar las reacciones sin el agregado de solvente fue precisamente 70°C, el punto de fusión de la misma. De esta forma es



posible asegurar que la totalidad de las especies en solución se encuentran en estado líquido, evitando potenciales problemas de limitaciones difusionales en el sistema. Por otro lado, la mayor temperatura utilizada en los sistemas con presencia de hexano fue de 60°C, tomándose un margen considerado aceptable por debajo del punto de ebullición de dicho solvente (69°C). Si los porcentajes de 1,3-DAG obtenidos en ausencia de hexano hubieran sido menores que los correspondientes a los sistemas con hexano a ambas temperaturas, se podría haber concluido que la presencia de este solvente disminuye la velocidad de isomerización. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitirían evaluar de manera independiente el efecto del mismo.

## 5.4. CONCLUSIONES

Se realizó una comparación entre las predicciones teóricas de los perfiles de triglicéridos y ácidos grasos en la posición *sn*-2 según diferentes teorías de distribución de los residuos acilo y los obtenidos experimentalmente luego del proceso de interesterificación enzimática de SO y FHSO. Las predicciones respecto al patrón de triglicéridos para ambas teorías resultaron ser similares debido a que no fue posible realizar un análisis de los mismos discriminando por isomería de posición. En cambio, la relación U/S en la posición *sn*-2 varía considerablemente con el mecanismo de redistribución de los residuos acilo. Los resultados reflejan que la relación  $U_2/S_2$  no se mantiene luego de la reacción enzimática, lo que evidencia la ocurrencia en simultáneo a la misma de una reacción química, la acil migración. También fue posible demostrarse que los productos obtenidos en distintas condiciones (relación de sustratos, tipo de biocatalizador, concentración de biocatalizador, y fundamentalmente tiempo de reacción) evidencian distintos cambios en la composición acídica *sn*-2 de sus glicéridos.

A partir de los resultados obtenidos del estudio del mecanismo de acil migración en los diglicéridos generados mediante la interesterificación enzimática se puede concluir que la enzima Lipozyme TL IM posee un efecto acelerador de dicho

fenómeno, el cual se cree se correlaciona con el material sobre el que se inmovilizó la lipasa (gel de sílice). Por otro lado, un aumento en la concentración de enzima y una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en las mezclas reactivas también promovieron la acil migración. Por el contrario, el agregado de hexano en el medio con la consecuente disminución de la temperatura de reacción, disminuyeron el desarrollo de este fenómeno indeseable. En cuanto a la temperatura, su efecto se evaluó sobre muestras interesterificadas en presencia de hexano, y los resultados permitieron corroborar el importante efecto que posee sobre la cinética de la reacción en cuestión, mostrando una correlación positiva con la velocidad de acil migración.

## 5.5. NOMENCLATURA

SO: aceite de soja refinado.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

FFA: ácidos grasos libres.

MAG: monoglicéridos.

DAG: diglicéridos.

TAG: triglicéridos.

U: ácido graso insaturado.

S: ácido graso saturado.

SSS: TAG trisaturado.

SUS: TAG disaturado/monoinsaturado.

UUS: TAG monosaturado/diinsaturado.

UUU: TAG triinsaturado.

S<sub>2</sub>: ácido graso saturado esterificado en posición *sn*-2.

U<sub>2</sub>: ácido graso insaturado esterificado en posición *sn*-2.

S<sub>1,3</sub>: ácido graso saturado esterificado en posición *sn*-1,3.

U<sub>1,3</sub>: ácido graso insaturado esterificado en posición *sn*-1,3.

## 5.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biotimes, [http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006\\_ES.pdf](http://www.biotimes.com/en/Articles/2006/December/Documents/December%202006_ES.pdf). Último acceso: 5/02/2012.

- Boswinkel, G.; J. Derksen; K. van't Riet y F. Cuperus (1996). *Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 73(6):707-711.
- Compton, D. L.; K. E. Vermillion y J. A. Laszlo (2007). *Acyl migration kinetics of 2-Monoacylglycerols from soybean oil via <sup>1</sup>H NMR*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 84(4):343-348.
- Du, W.; Y. Y. Xu; D. H. Liu y Z. B. Li (2005). *Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 37(1-6):68-71.
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). *Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62(3-4):197-212.
- Ferrari, R.; W. Esteves y K. Mukherjee (1997). *Alteration of steryl ester content and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols by chemical and enzymatic interesterification of plant oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(2):93-96.
- Freeman, I. P. y I. D. Morton (1966). *Acyl migration in diglycerides*. Journal of the Chemical Society C: Organic. 0:1710-1711.
- Goh, S. H.; S. K. Yeong y C. W. Wang (1993). *Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: Effect of solvent on 1,3-specificity*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 70(6):567-570.
- Hunter, J. (2001). *Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides*. Lipids. 36(7):655-668.
- Hustedt, H. (1976). *Interesterification of edible oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 53(6):390-392.
- Kaieda, M.; T. Samukawa; T. Matsumoto; K. Ban; A. Kondo; Y. Shimada; H. Noda; F. Nomoto; K. Ohtsuka; E. Izumoto y H. Fukuda (1999). *Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 88(6):627-631.
- Kodali, D. R.; A. Tercyak; D. A. Fahey y D. M. Small (1990). *Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol*. Chemistry and Physics of Lipids. 52(3-4):163-170.
- Laszlo, J.; D. Compton y K. Vermillion (2008). *Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85(4):307-312.
- Mattson, F. H. y R. A. Volpenhein (1962). *Synthesis and properties of glycerides*. Journal of Lipid Research. 3(3):281-296.
- Oda, M.; M. Kaieda; S. Hama; H. Yamaji; A. Kondo; E. Izumoto y H. Fukuda (2005). *Facilitatory effect of immobilized lipase-producing Rhizopus oryzae cells on acyl migration in biodiesel-fuel production*. Biochemical Engineering Journal. 23(1):45-51.
- Ray, S. y D. Bhattacharyya (1995). *Comparative nutritional study of enzymatically and chemically interesterified palm oil products*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(3):327-330.
- Ribeiro, A.; R. Basso; R. Grimaldi; L. Gioielli y L. Gonçalves (2009). *Instrumental Methods for the Evaluation of Interesterified Fats*. Food Analytical Methods. 2(4):282-302.

- Rodriguez, J. A.; L. D. Mendoza; F. Pezzotti; N. Vanthuynne; J. Leclaire; R. Verger; G. Buono; F. Carriere y F. Fotiadu (2008). *Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases*. Analytical Biochemistry. 375(2):196-208.
- Serdarevich, B. (1967). *Glyceride isomerizations in lipid chemistry*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 44(7):381-393.
- Sjursnes, B.; L. Kvittingen y T. Anthonsen (1995). *Regioselective lipase-catalyzed transesterification of tributyrin. Influence of salt hydrates on acyl migration*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(5):533-537.
- Wang, Y.; H. Wu y M. H. Zong (2008). *Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer*. Bioresource Technology. 99(15):7232-7237.
- Xu, X.; A. Skands; C. Høy; H. Mu; S. Balchen y J. Adler-Nissen (1998). *Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of Acyl migration by response surface design*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(12):1179-1186.
- Yang, T.; M.-B. Fruekilde y X. Xu (2005). *Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming*. Food Chemistry. 92(1):101-107.
- Zhang, H.; X. Xu; J. Nilsson; H. Mu; J. Adler-Nissen y C.-E. Høy (2001). *Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated Thermomyces lanuginosa lipase in a large-scale study*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(1):57-64.

# 6. MODELADO CINÉTICO

---

## 6.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la dilucidación de los mecanismos involucrados en las reacciones catalizadas por lipasas para la modificación de las propiedades de grasas y aceites y el modelado de su cinética representa un verdadero desafío.

En la literatura existen numerosos estudios sobre reacciones catalizadas por lipasas; sin embargo, se dispone de muy poca información respecto a los modelos cinéticos y sus parámetros (Romero et al., 2007). La importancia de los mismos está relacionada fundamentalmente con dos factores: por un lado contribuyen a echar luz sobre los mecanismos de acción de dichas enzimas y la cinética de las reacciones biocatalizadas y, por otro, permiten establecer relaciones entre las variables y la velocidad de reacción, información fundamental para el diseño racional de reactores a escala industrial (Miller et al., 1991).

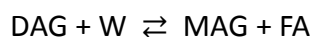
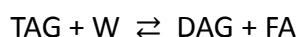
La lipólisis es por naturaleza una reacción multisustrato y multiproducto; por lo tanto, las expresiones de velocidad de reacción resultantes contienen un gran número de parámetros, lo que dificulta la manipulación de las mismas. Por esta razón, muchos investigadores han optado por focalizarse en sistemas modelo que involucren un número reducido de especies químicas; o, alternativamente, trabajar con sistemas complejos aplicando aproximaciones que permitan reunir a las diferentes especies en un número aceptable de grupos de compuestos (Paiva et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de los estudios cinéticos de reacciones catalizadas por lipasas se limitan a la etapa de hidrólisis, siendo mucho menor la cantidad de trabajos concernientes a la esterificación (Romero et al., 2007). Más aún, en la literatura se presentan estudios cinéticos aplicados a reacciones entre triglicéridos y diversos sustratos: ácidos grasos libres (acidólisis) (Ortega et al., 2004; Camacho et al., 2007); alcoholes de bajo peso molecular (transesterificación) (Pessoa et al., 2009; Magalhães et al., 2010) y glicerol (glicerólisis) (Cheirsilp et al., 2007; Voll et al., 2011). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado registro de ningún estudio cinético en reacciones enzimáticas que involucren el intercambio de grupos acilo entre triglicéridos.

En consecuencia, el objetivo planteado para el presente capítulo consistió en realizar aportes a la tarea de esclarecer los posibles mecanismos de acción de las lipasas en la reacción en estudio y evaluar la capacidad de los modelos resultantes para representar el comportamiento observado experimentalmente.

## 6.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 6.2.1. MECANISMOS DE REACCIÓN

La serie de reacciones que se llevan a cabo durante la interesterificación de aceites y grasas puede esquematizarse de acuerdo a lo mostrado en la Figura 6.1.

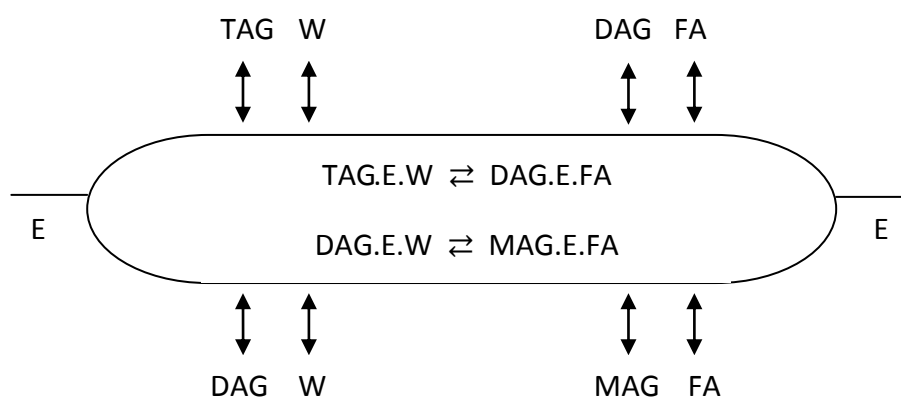


**Figura 6.1.** Esquema general de reacción.  
TAG: triglicérido, DAG: diglicérido, MAG: monoglicérido, FA: ácido graso, W: agua.

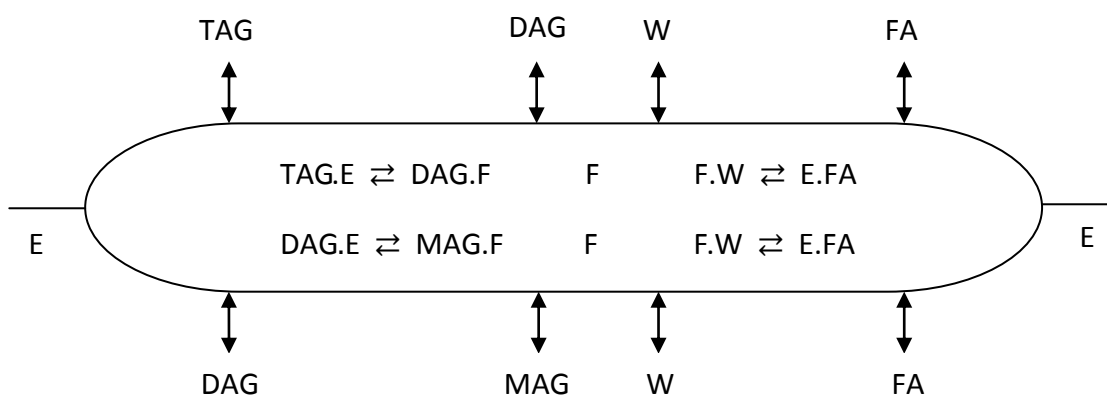
Cabe aclarar que la reacción de hidrólisis de monoglicéridos a glicerol no se incluye debido a que se comprobó experimentalmente la ausencia de dicho alcohol en los productos de reacción obtenidos a todos los tiempos.

En general, se cree que la acción de las lipasas puede responder a dos mecanismos catalíticos diferentes: Bi Bi Ordenado o Ping Pong Bi Bi. La designación Bi Bi indica la presencia de dos sustratos y dos productos participando de la reacción, mientras que los términos “Ordenado” o “Ping Pong” se refieren al orden en el cual se unen y liberan dichos sustratos y productos de la enzima. En el primer caso (*Mecanismo 1*), la formación de los productos de la reacción sólo es posible luego de la formación de un complejo enzima-sustratos; mientras que en el segundo (*Mecanismo 2*) la entrada de sustratos y productos se realiza en forma secuencial, es decir que los productos se liberan en pasos intermedios entre etapas de adición de sustratos y

posterior formación de los correspondientes complejos enzima-sustrato. En la Figura 6.2. se esquematizan ambos mecanismos aplicados a las etapas de hidrólisis y esterificación. Cuando se analiza la reacción de interesterificación en su conjunto, la cual involucra ambas etapas, aún el mecanismo representado por la Figura 6.2. (a) puede ser clasificado como un híbrido entre un mecanismo ordenado y uno de tipo Ping Pong.



(a)



(b)

**Figura 6.2.** Posibles mecanismos de acción de la lipasa. (a) *Mecanismo 1*: la enzima se acompleja sin acilación y (b) *Mecanismo 2*: la enzima forma complejos acilándose.

TAG: triglicérido, DAG: diglicérido, MAG: monoglicérido, FA: ácido graso,  
W: agua, E: enzima, F: enzima acilada.

Según el mecanismo representado por la Figura 6.2. (a) la enzima forma un complejo con ambos sustratos que, luego de la ruptura/formación de la unión éster,



isomeriza a un segundo complejo, etapa previa al paso final, el cual consiste en la liberación de los productos. En el caso del mecanismo descrito por la Figura 6.2. (b), la enzima se acompleja con el residuo acilo del ácido graso, modificando su conformación; formándose así la enzima acilada, denotada por F.

Independientemente del tipo de reacción catalizada, la descripción más general y aceptada de la acción catalítica de las lipasas es el mecanismo Ping Pong Bi Bi para cada una de las etapas, incluyendo el fenómeno de acilación de la enzima. Sin embargo, existen trabajos recientes en los que se plantea la hipótesis de un mecanismo de tipo ordenado sin acilación de la enzima para reacciones de glicerólisis (Cheirsilp et al., 2007; Voll et al., 2011).

### 6.2.2. DERIVACIÓN DE EXPRESIONES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN

La derivación y resolución de modelos cinéticos medianamente simplificados requiere realizar algunas hipótesis. La *hipótesis de rápido equilibrio*, también denominada “de etapa limitante”, se basa en suponer que todos los pasos del sistema de reacción alcanzan el equilibrio rápidamente, exceptuando uno de ellos. Por lo tanto, la velocidad de reacción global queda definida por la velocidad de dicha etapa.

Sin embargo, existen muchos sistemas multisustratos que no pueden ser representados adecuadamente por expresiones de velocidad derivadas a partir de la hipótesis anteriormente descrita debido a que los pasos de isomerización de los complejos centrales y la liberación posterior de productos son tan rápidos que las diferentes especies enzimáticas nunca logran llegar al equilibrio (Segel, 1993). En estos casos es aplicable la teoría más general de Briggs y Haldane (1925), la cual postula que los complejos enzimáticos no necesariamente se encuentran en equilibrio, sino que logran una concentración de “estado estacionario” prácticamente constante. A este enfoque se lo denomina “*hipótesis de estado estacionario*”.

El tratamiento de *rápido equilibrio* permite deducir ecuaciones de velocidad de reacción para sistemas complejos luego de una simple inspección de los equilibrios entre las diversas especies enzimáticas. En caso de que los datos experimentales

puedan ser representados por expresiones derivadas según este enfoque, se obtiene el modelo cinético más simple para el sistema; si esto no ocurre, entonces se debe proceder a la derivación de modelos más complejos aplicando la hipótesis de estado estacionario. De hecho, si la hipótesis de *rápido equilibrio* aplica, las expresiones que se obtienen por ambos métodos poseen la misma forma, pero difieren en las definiciones de las constantes involucradas (Segel, 1993).

La derivación de las ecuaciones de velocidad de reacción para la hipótesis de rápido equilibrio son fácilmente deducidas a partir de las definiciones de las constantes de equilibrio para cada uno de los pasos que lo alcanza.

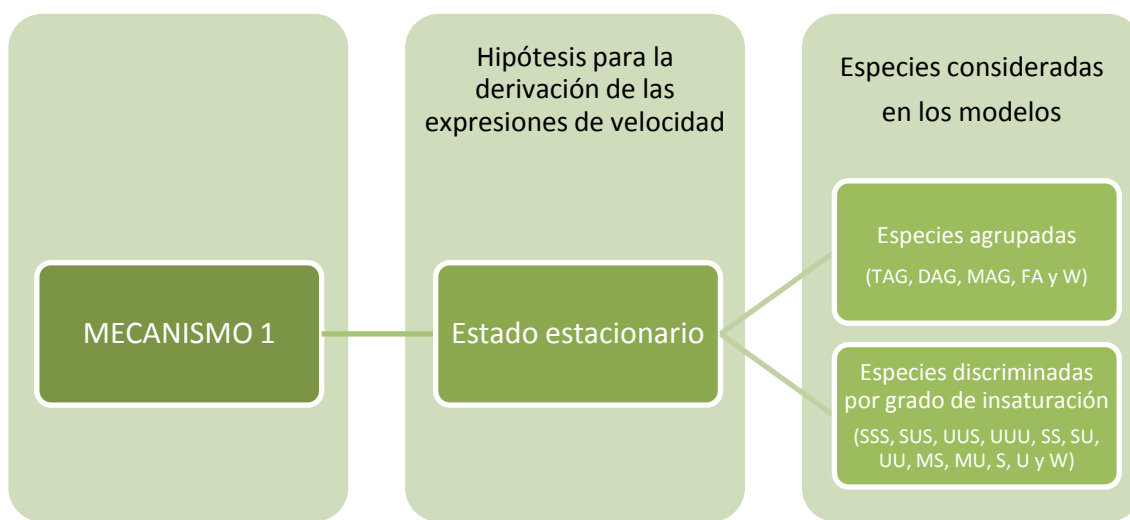
Por otro lado, si se aplica la hipótesis de estado estacionario, es decir, si se igualan las velocidades de cambio de las concentraciones de la totalidad de los complejos enzimáticos a cero, la complejidad de las manipulaciones algebraicas aumenta sustancialmente a medida que lo hace el número de especies enzimáticas involucradas. En consecuencia, King y Altman (1956) desarrollaron un método esquemático para simplificar significativamente dichas derivaciones. En la presente tesis se obviarán la derivación de las expresiones obtenidas mediante este método; el mismo puede consultarse en bibliografía general sobre cinética enzimática (Segel, 1993; Kuby, 2000).

### 6.3. MODELOS CINÉTICOS

En esta sección se presentan los modelos cinéticos derivados a partir de las consideraciones mencionadas en las secciones precedentes. Se obtuvo un número importante de modelos, aunque algunos de ellos resultaron poseer un número elevado de parámetros, siendo impracticable su aplicación a conjuntos de datos experimentales de tamaños razonables. De todas formas, los mismos se presentan con el objetivo de evidenciar la complejidad que el modelado del sistema en estudio reviste.

### 6.3.1. MECANISMO 1

En esta sección se desarrollan modelos deducidos a partir de la suposición de que la enzima forma complejos con las diferentes especies involucradas en el sistema de reacción sin sufrir acilación, de acuerdo al esquema de organización descrito en la Figura 6.3.

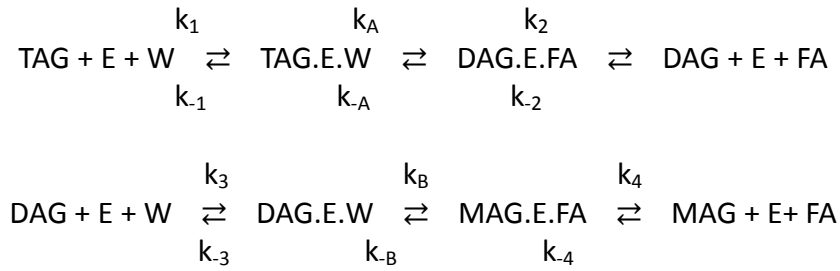


**Figura 6.3.** Organización de la sección 6.3.1.

Debido a la relativa sencillez del sistema de reacciones planteado, se derivaron expresiones de velocidad únicamente aplicando la hipótesis más razonable de *estado estacionario*. Se presentan dos modelos diferentes, el primero desarrollado considerando a los compuestos mayoritarios de los sistemas como grupos (TAG, DAG, MAG y FA) y el segundo realizando una discriminación por grado de insaturación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos involucrados en cada una de dichas especies (SSS, SUS, UUS, UUU para TAG; SS, SU, UU para DAG, MS, MU para MAG y S, U para FA).

#### 6.3.1.1. COMPUESTOS AGRUPADOS

En la Figura 6.4. se presentan las reacciones que se llevan a cabo suponiendo válido el Mecanismo 1.



**Figura 6.4.** Esquema de reacciones correspondientes al Mecanismo 1 agrupando a las diferentes especies.

El modelo cinético resultante para representar este esquema de reacciones puede ser representado por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},r}^{\text{TAG}} K_M^{\text{TAG}} [\text{DAG}][\text{FA}] - v_{\text{máx},f}^{\text{TAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} [\text{TAG}][\text{W}]}{\text{denom}} \quad (6-1)$$

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{TAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},f}^{\text{MAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} \left( \frac{K_M^{\text{TAG}}}{K_M^{\text{MAG}}} \right) [\text{MAG}][\text{FA}]}{\text{denom}} \quad (6-2)$$

$$\frac{-v_{\text{máx},r}^{\text{TAG}} K_M^{\text{TAG}} [\text{DAG}][\text{FA}] - v_{\text{máx},r}^{\text{MAG}} K_M^{\text{TAG}} \left( \frac{K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}}}{K_{i,\text{DAG}}^{\text{hid}}} \right) [\text{DAG}][\text{W}]}{\text{denom}}$$

$$\frac{d[\text{MAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},r}^{\text{MAG}} K_M^{\text{TAG}} \left( \frac{K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}}}{K_{i,\text{DAG}}^{\text{hid}}} \right) [\text{DAG}][\text{W}] - v_{\text{máx},f}^{\text{MAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} \left( \frac{K_M^{\text{TAG}}}{K_M^{\text{MAG}}} \right) [\text{MAG}][\text{FA}]}{\text{denom}} \quad (6-3)$$

$$\frac{d[\text{FA}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{TAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{MAG}} K_M^{\text{TAG}} \left( \frac{K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}}}{K_{i,\text{DAG}}^{\text{hid}}} \right) [\text{DAG}][\text{W}]}{\text{denom}} \quad (6-4)$$

$$\frac{-v_{\text{máx},r}^{\text{TAG}} K_M^{\text{TAG}} [\text{DAG}][\text{FA}] - v_{\text{máx},f}^{\text{MAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} \left( \frac{K_M^{\text{TAG}}}{K_M^{\text{MAG}}} \right) [\text{MAG}][\text{FA}]}{\text{denom}}$$

$$\frac{d[W]}{dt} = - \frac{d[FA]}{dt} \quad (6-5)$$

con

$$\begin{aligned} \text{denom} = & K_M^{\text{TAG}} K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} + K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} [\text{TAG}][W] + K_M^{\text{TAG}} [\text{DAG}][FA] + K_M^{\text{TAG}} \left( \frac{K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}}}{K_{i,\text{DAG}}^{\text{hid}}} \right) [\text{DAG}][W] \\ & + K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} \left( \frac{K_M^{\text{TAG}}}{K_M^{\text{MAG}}} \right) [\text{MAG}][FA] \end{aligned}$$

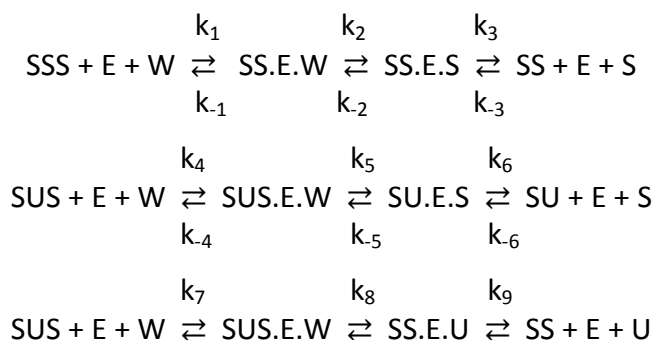
$$v_{\text{máx},f}^{\text{TAG}} = k_2 [E]_T \quad v_{\text{máx},r}^{\text{TAG}} = k_{-1} [E]_T \quad v_{\text{máx},f}^{\text{MAG}} = k_{-3} [E]_T \quad v_{\text{máx},r}^{\text{MAG}} = k_4 [E]_T$$

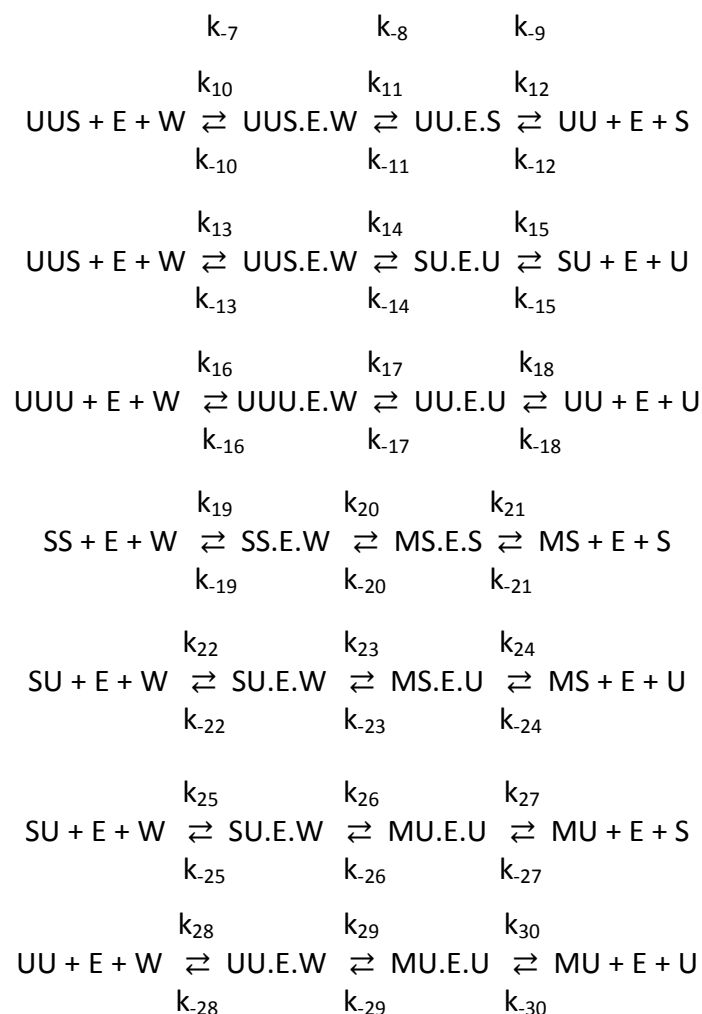
$$K_M^{\text{TAG}} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad K_M^{\text{MAG}} = \frac{(k_{-3} + k_4)}{k_{-4}} \quad K_{i,\text{DAG}}^{\text{est}} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_{-2}} \quad K_{i,\text{DAG}}^{\text{hid}} = \frac{(k_{-3} + k_4)}{k_3}$$

Donde [J] es la concentración molar de la especie agrupada J, t el tiempo de reacción,  $v_{\text{máx}}^J$  la velocidad máxima de la reacción enzimática para la especie J,  $k_i$  y  $k_{-i}$  las constantes de la reacción i,  $[E]_T$  la concentración de enzima total,  $K_M^J$  la constante de Michaelis-Menten para la especie J,  $K_{i,J}^{\text{hid}}$  y  $K_{i,J}^{\text{est}}$  las constantes inhibitorias de la especie J en las reacciones de hidrólisis y esterificación respectivamente.

### 6.3.1.2. COMPUESTOS DISCRIMINADOS POR GRADO DE INSATURACIÓN

Las reacciones que ocurren en el sistema para este caso vienen dadas por la Figura 6.5.





**Figura 6.5.** Esquema de reacciones correspondientes al Mecanismo 1 discriminando a las diferentes especies según grado de insaturación.

El modelo cinético resultante está dado por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[SSS]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{SSS}} \prod_{i \neq 1} K_i [SSS][W] + v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SSS}} \prod_{i \neq 5} [SS][S]}{\text{denom}} \quad (6-6)$$

$$\frac{d[SUS]}{dt} = \frac{- (v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SU}} + v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SS}}) \prod_{i \neq 2} K_i [SUS][W] + v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SUS}} \prod_{i \neq 6} K_i [SS][U] + v_{\text{máx},r}^{\text{SU} \rightarrow \text{SUS}} \prod_{i \neq 8} [SU][S]}{\text{denom}} \quad (6-7)$$

$$\frac{d[\text{UUS}]}{dt} = \frac{- (v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{US}} + v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{UU}}) \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{SU} \rightarrow \text{UUS}} \prod_{i \neq 9} K_i [\text{SU}][\text{U}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUS}} \prod_{i \neq 11} K_i [\text{UU}][\text{S}]}{\text{denom}} \quad (6-8)$$

$$\frac{d[\text{UUU}]}{dt} = \frac{- v_{\text{máx},f}^{\text{UUU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 4} K_i [\text{UUU}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUU}} \prod_{i \neq 12} K_i [\text{UU}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-9)$$

$$\frac{d[\text{SS}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SSS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 1} K_i [\text{SSS}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SSS}} \prod_{i \neq 5} K_i [\text{SS}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 2} K_i [\text{SUS}][\text{W}] - (v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SUS}} + \frac{\text{AE}}{\text{E}}) \prod_{i \neq 6} K_i [\text{SS}][\text{U}]}{\text{denom}} - \frac{\frac{\text{AF}}{\text{G}} \prod_{i \neq 8} K_i [\text{SU}][\text{S}] - v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 7} K_i [\text{SS}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 14} K_i [\text{MS}][\text{S}]}{\text{denom}} \quad (6-10)$$

$$\frac{d[\text{SU}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{US}} \prod_{i \neq 2} K_i [\text{SUS}][\text{W}] + v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{US}} \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][\text{W}]}{\text{denom}} - \frac{(v_{\text{máx},r}^{\text{SU} \rightarrow \text{SUS}} + \frac{\text{AF}}{\text{G}}) \prod_{i \neq 8} K_i [\text{SU}][\text{S}] + \frac{\text{AE}}{\text{E}} \prod_{i \neq 6} K_i [\text{SS}][\text{U}]}{\text{denom}} - \frac{(v_{\text{máx},r}^{\text{SU} \rightarrow \text{UUS}} + \frac{\text{AI}}{\text{A}}) \prod_{i \neq 9} K_i [\text{SU}][\text{U}] + \frac{\text{AJ}}{\text{J}} \prod_{i \neq 11} K_i [\text{UU}][\text{S}]}{\text{denom}} - \frac{(v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MS}} + v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MU}}) \prod_{i \neq 10} K_i [\text{SU}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{SU}} \prod_{i \neq 16} K_i [\text{MU}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SU}} \prod_{i \neq 15} K_i [\text{MS}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-11)$$

$$\frac{d[\text{UU}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][\text{W}] - (v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUS}} + \frac{\text{AJ}}{\text{J}}) \prod_{i \neq 11} K_i [\text{UU}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{\frac{\text{AI}}{\text{H}} \prod_{i \neq 9} K_i [\text{SU}][\text{U}] + v_{\text{máx},f}^{\text{UUU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 4} K_i [\text{UUU}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUU}} \prod_{i \neq 12} K_i [\text{UU}][\text{U}]}{\text{denom}} - \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{MU}} \prod_{i \neq 13} K_i [\text{UU}][\text{W}] + v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 17} K_i [\text{MU}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-12)$$

$$\frac{d[\text{MS}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 7} K_i [\text{SS}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 14} K_i [\text{MS}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 16} K_i [\text{SU}][\text{W}] + \frac{\text{AS}}{\text{O}} \prod_{i \neq 16} K_i [\text{MU}][\text{S}]}{\text{denom}} - \frac{\left( v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SU}} + \frac{\text{AT}}{\text{N}} \right) \prod_{i \neq 15} K_i [\text{MS}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-13)$$

$$\frac{d[\text{MU}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MU}} \prod_{i \neq 15} K_i [\text{SU}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{SU}} + \frac{\text{AS}}{\text{O}} \right) \prod_{i \neq 16} K_i [\text{MU}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{\frac{\text{AT}}{\text{N}} \prod_{i \neq 15} K_i [\text{MS}][\text{U}] + v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{MU}} \prod_{i \neq 13} K_i [\text{UU}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 17} K_i [\text{MU}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-14)$$

$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 1} K_i [\text{SSS}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SSS}} \prod_{i \neq 5} K_i [\text{SS}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 2} K_i [\text{SUS}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SUS}} + \frac{\text{AF}}{\text{G}} \right) \prod_{i \neq 8} K_i [\text{SU}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUS}} + \frac{\text{AJ}}{\text{J}} \right) \prod_{i \neq 11} K_i [\text{UU}][\text{S}]}{\text{denom}} - \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 7} K_i [\text{SS}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 14} K_i [\text{MS}][\text{S}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MU}} \prod_{i \neq 10} K_i [\text{SU}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{SU}} + \frac{\text{AS}}{\text{O}} \right) \prod_{i \neq 16} K_i [\text{MU}][\text{S}]}{\text{denom}} \quad (6.15)$$

$$\frac{d[\text{U}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SS}} \prod_{i \neq 2} K_i [\text{SUS}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{SS} \rightarrow \text{SUS}} + \frac{\text{AE}}{\text{E}} \right) \prod_{i \neq 6} K_i [\text{SS}][\text{U}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{SU}} \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{SU} \rightarrow \text{UUS}} + \frac{\text{AI}}{\text{H}} \right) \prod_{i \neq 9} K_i [\text{SU}][\text{U}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UUU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 4} K_i [\text{UUU}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUU}} \prod_{i \neq 12} K_i [\text{UU}][\text{U}]}{\text{denom}} + \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MS}} \prod_{i \neq 10} K_i [\text{SU}][\text{W}] - \left( v_{\text{máx},r}^{\text{MS} \rightarrow \text{SU}} + \frac{\text{AT}}{\text{N}} \right) \prod_{i \neq 15} K_i [\text{MS}][\text{U}]}{\text{denom}} - \frac{v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{MU}} \prod_{i \neq 13} K_i [\text{UU}][\text{W}] - v_{\text{máx},r}^{\text{MU} \rightarrow \text{UU}} \prod_{i \neq 17} K_i [\text{MU}][\text{U}]}{\text{denom}} \quad (6-16)$$



Con:

$$\begin{aligned}
 \text{denom} = & \prod_{i=1}^{17} K_i + \prod_{i \neq 1} K_i [\text{SSS}][W] + \prod_{i \neq 2} K_i [\text{SUS}][W] + \prod_{i \neq 3} K_i [\text{UUS}][W] \\
 & + \prod_{i \neq 4} K_i [\text{UUU}][W] + \prod_{i \neq 5} K_i [\text{SS}][S] + \prod_{i \neq 6} K_i [\text{SS}][U] + \prod_{i \neq 7} K_i [\text{SS}][W] \\
 & + \prod_{i \neq 8} K_i [\text{SU}][S] + \prod_{i \neq 9} K_i [\text{SUS}][U] + \prod_{i \neq 10} K_i [\text{SU}][W] + \prod_{i \neq 11} K_i [\text{UU}][S] \\
 & + \prod_{i \neq 12} K_i [\text{UU}][U] + \prod_{i \neq 13} K_i [\text{UU}][W] + \prod_{i \neq 14} K_i [\text{MS}][S] + \prod_{i \neq 15} K_i [\text{MS}][U] \\
 & + \prod_{i \neq 16} K_i [\text{MU}][S] + \prod_{i \neq 17} K_i [\text{MU}][U]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 v_{\text{máx},f}^{\text{SSS} \rightarrow \text{SS}} &= \frac{R}{Q} & v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{SSS}} &= \frac{S}{D} & v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{SS}} &= \frac{U}{A} & v_{\text{máx},f}^{\text{SUS} \rightarrow \text{US}} &= \frac{T}{A} \\
 v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{SUS}} &= \frac{V}{E} & v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{SUS}} &= \frac{W}{G} & v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{US}} &= \frac{X}{B} & v_{\text{máx},f}^{\text{UUS} \rightarrow \text{UU}} &= \frac{Y}{B} \\
 v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{UUS}} &= \frac{AB}{J} & v_{\text{máx},f}^{\text{UUU} \rightarrow \text{UU}} &= \frac{AC}{C} & v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{UUU}} &= \frac{AD}{K} & v_{\text{máx},f}^{\text{SS} \rightarrow \text{MS}} &= \frac{AG}{F} \\
 v_{\text{máx},f}^{\text{MS} \rightarrow \text{SS}} &= \frac{AH}{M} & v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MS}} &= \frac{AK}{I} & v_{\text{máx},f}^{\text{SU} \rightarrow \text{MU}} &= \frac{AL}{I} & v_{\text{máx},f}^{\text{MU} \rightarrow \text{SU}} &= \frac{AM}{O} \\
 v_{\text{máx},f}^{\text{MS} \rightarrow \text{SU}} &= \frac{AN}{N} & v_{\text{máx},f}^{\text{UU} \rightarrow \text{MU}} &= \frac{AO}{L} & v_{\text{máx},f}^{\text{MU} \rightarrow \text{UU}} &= \frac{AP}{P} & K_{\text{SSS}} &= \frac{C_7}{Q} \\
 K_{\text{SS}}^S &= \frac{C_7}{D} & K_{\text{SUS}} &= \frac{C_1}{A} & K_{\text{SS}}^U &= \frac{C_1}{E} & K_{\text{SU}}^S &= \frac{C_1}{G} \\
 K_{\text{UUS}} &= \frac{C_4}{B} & K_{\text{SU}}^U &= \frac{C_4}{H} & K_{\text{UU}}^S &= \frac{C_4}{J} & K_{\text{UUU}} &= \frac{C_6}{C} \\
 K_{\text{UU}}^U &= \frac{C_6}{K} & K_{\text{SS}} &= \frac{C_2}{F} & K_{\text{MS}}^S &= \frac{C_2}{M} & K_{\text{SU}} &= \frac{C_5}{F} \\
 K_{\text{MU}}^S &= \frac{C_5}{O} & K_{\text{MS}}^U &= \frac{C_5}{N} & K_{\text{UU}} &= \frac{C_3}{L} & K_{\text{MU}}^U &= \frac{C_3}{P}
 \end{aligned}$$

$$C_1 = (k_{.4} + k_{.7})(k_{.5} + k_6)(k_{.8} + k_9) + k_6 (k_5 k_{.8} + k_5 k_9 + k_8 k_9) + k_{.5} k_8 k_9$$

$$C_2 = (k_{-19} + k_{20})(k_{-20} + k_{21}) - k_{20} k_{-20}$$

$$C_3 = (k_{-28} + k_{29})(k_{30} + k_{-29}) - k_{-29} k_{29}$$

$$C_4 = (k_{-10} + k_{-13})(k_{-11} + k_{12})(k_{-14} + k_{15}) + k_{14} k_{15} (k_{-11} k_{12}) + k_{11} k_{12} (k_{-14} + k_{15})$$

$$C_5 = (k_{-26} + k_{27})(k_{-22} + k_{-25})(k_{-23} + k_{24}) + (k_{27} + k_{-26}) k_{23} k_{24} + k_{26} (k_{24} + k_{-23}) k_{27}$$

$$C_6 = k_{-16} k_{-17} + k_{-16} k_{18} + k_{17} k_{18}$$

$$C_7 = k_{-1} k_{-2} + k_2 k_3 + k_{-1} k_3$$

$$A = (k_4 + k_2)[(k_{-5} + k_6)(k_8 + k_{-8} + k_9) + k_5 (k_{-8} + k_9)]$$

$$B = (k_{10} + k_{13})[(k_{-11} + k_{12})(k_{14} + k_{-14} + k_{15}) + k_4 (k_{-14} + k_{15})]$$

$$C = k_{16} (k_{-17} + k_{17} + k_{18})$$

$$D = k_{-3} (k_{-1} + k_{-2} + k_2)$$

$$E = k_{-5}[(k_{-5} + k_6)(k_{-8} + k_{-4} + k_{-7} + k_8) + k_5 k_{-8}]$$

$$F = k_{19} (k_{-20} + k_{21} + k_{20})$$

$$G = k_{-6} [(k_{-8} + k_9)[(k_{-4} + k_5 + k_{-7} + k_8 + k_{-5}) - k_8 (k_{-8} - k_{-5})]$$

$$H = k_{-15} [(k_{-11} + k_{12})[(k_{-10} + k_{-13} + k_{14} + k_{-14}) + k_{11} (k_{12} + k_{-14})]$$

$$I = (k_{22} + k_{25})[(k_{-26} + k_{27})(k_{-23} + k_{24} + k_{23}) + k_{26} (k_{24} + k_{-23})]$$

$$J = k_{-12} \{k_{-11} k_{14} + [(k_{10} + k_{11})(k_{-14} + k_{15}) + (k_{-13} + k_{14} + k_{-11})(k_{-14} + k_{15}) - k_{14} k_{-14}]\}$$

$$K = k_{-18} (k_{-16} + k_{17} + k_{-17})$$

$$L = k_{28} (k_{29} + k_{-29} + k_{30})$$

$$M = k_{-21} (k_{-20} + k_{-19} + k_{20})$$

$$N = k_{-24} [(k_{-26} + k_{27})(k_{-23} + k_{-25} + k_{-22}) + k_{27} (k_{23} + k_{26}) + k_{23} k_{-26} + k_{-23} k_{26}]$$

$$O = k_{-27} [(k_{-26} + k_{23} + (k_{-23} + k_{24})(k_{-26} + k_{-22} + k_{26} + k_{-25} + k_{23}) - k_{23} k_{-23}]$$

$$P = k_{-30} (k_{29} + k_{-29} + k_{-28})$$

$$Q = k_1 (k_3 + k_{-2} + k_2)$$

$$R = k_1 k_2 k_3 [E]_T$$

$$S = k_{-1} k_{-2} k_{-3} [E]_T$$

$$T = k_5 k_6 (k_4 + k_2)(k_{-8} + k_9) [E]_T$$

$$U = k_8 k_9 (k_4 + k_7)(k_{-5} + k_6) [E]_T$$

$$V = k_{-9} k_{-8} (k_{-5} + k_6)(k_{-4} + k_{-7}) [E]_T$$

$$W = k_{-5} k_{-6} (k_{-8} + k_8)(k_{-4} + k_{-7}) [E]_T$$

$$X = k_{14} k_5 (k_{-11} + k_{12})(k_{10} + k_{13}) [E]_T$$

$$Y = k_{11} k_{12} (k_{-14} + k_{15})(k_{10} + k_{13}) [E]_T$$

$$Z = k_{-14} k_{-15} (k_{-11} + k_{12})(k_{-10} + k_{-13}) [E]_T$$

$$AB = k_{-4} k_{-12} (k_{-14} + k_{15})(k_{-10} + k_{-13}) [E]_T$$

$$AC = k_{16} k_{17} k_{18} [E]_T$$

$$AD = k_{-16} k_{-17} k_{-18} [E]_T$$

$$AE = k_5 k_6 k_{-8} k_{-9} [E]_T$$

$$AF = k_8 k_9 k_{-5} k_{-6} [E]_T$$

$$AG = k_{19} k_{20} k_{21} [E]_T$$

$$AH = k_{-19} k_{-20} k_{-21} [E]_T$$

$$AI = k_{11} k_{12} k_{-14} k_{-15} [E]_T$$

$$AJ = k_{-11} k_{-12} k_{14} k_{15} [E]_T$$

$$AK = k_{23} k_{24} (k_{-26} + k_{27})(k_{22} + k_{25}) [E]_T$$

$$AL = k_{26} k_{27} (k_{-23} + k_{24})(k_{22} + k_{25}) [E]_T$$

$$AM = k_{-26} k_{-27} (k_{-23} + k_{24})(k_{-22} + k_{-25}) [E]_T$$

$$AN = k_{-23} k_{-24} (k_{-26} + k_{27})(k_{-22} + k_{-25}) [E]_T$$

$$AO = k_{28} k_{29} k_{30} [E]_T$$

$$AP = k_{-28} k_{-29} k_{-30} [E]_T$$

$$AS = k_{-27} k_{-26} k_{23} k_{24} [E]_T$$

$$AT = k_{26} k_{27} k_{-23} k_{-24} [E]_T$$

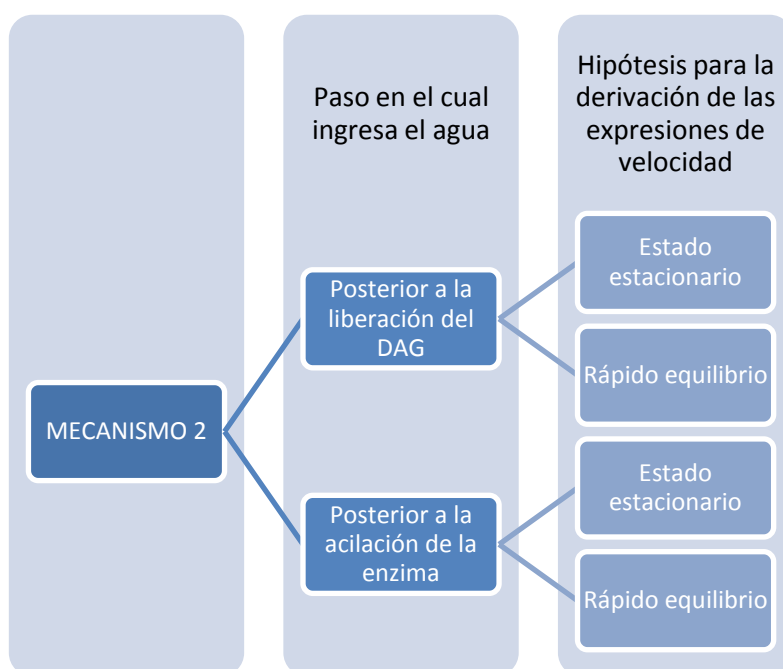
Donde  $[J]$  es la concentración molar de la especie agrupada  $J$ ,  $t$  el tiempo de reacción,  $v_{m\acute{a}x}^J$  la velocidad máxima de la reacción enzimática para la especie  $J$ ,  $k_i$  y  $k_{-i}$

las constantes de la reacción  $i$ ,  $[E]_T$  la concentración de enzima total y  $K_j$ ,  $C_i$  y las expresiones denominadas A a AT parámetros cinéticos.

Como puede observarse, el número de parámetros cinéticos a ajustar es extremadamente elevado, resultando impracticable el ajuste de datos experimentales a un modelo de semejante dimensión.

### 6.3.2. MECANISMO 2

Aquí se presentan las expresiones de velocidad de reacción para el caso en que se considere que la enzima forma un complejo acilado con las diferentes especies. Se derivaron modelos aplicando los dos enfoques detallados en la sección 2.2.2., de acuerdo al esquema de organización mostrado en la Figura 6.6.



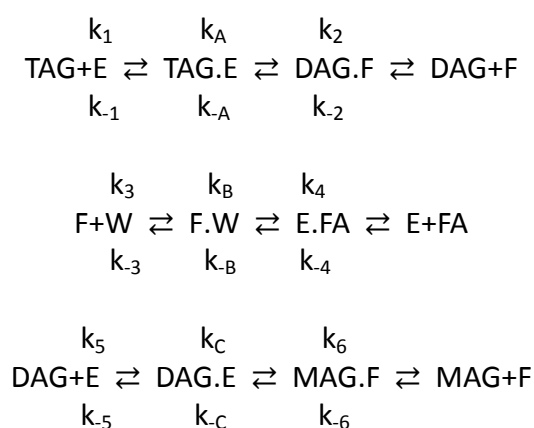
**Figura 6.6.** Organización de la sección 6.3.2.

En este caso, el ingreso de la molécula de agua puede producirse en más de una etapa. En primera instancia, se considera que ésta lo hace en la etapa posterior a la acilación de la enzima, suposición generalmente utilizada en la literatura (Paiva et al., 2000).

Posteriormente se presenta un modelo en el cual se consideró que el ingreso ocurre en otra instancia, de manera de ilustrar el aumento en la complejidad de las expresiones generado por dicho cambio. Las derivaciones se realizaron aplicando ambas hipótesis; a modo de ejemplo para el caso del enfoque de rápido equilibrio se presenta una sola expresión, obtenida para un único paso.

### 6.3.2.1. INGRESO DEL AGUA EN LA ETAPA POSTERIOR A LA LIBERACIÓN DEL DAG

En la Figura 6.7 se representan las reacciones que se estarían llevando a cabo en el sistema de reacción.



**Figura 6.7.** Esquema de reacciones correspondientes al Mecanismo 2 con el agua ingresando en el paso posterior a la liberación del DAG, agrupando a las diferentes especies.

#### 6.3.2.1.1. HIPÓTESIS DE RÁPIDO EQUILIBRIO

Las siguientes ecuaciones describen las relaciones de equilibrio para cada una de las etapas de reacción.

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{TAG.E}]}{[\text{TAG}][\text{E}]} \quad (6-17)$$

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[\text{DAG.F}]}{[\text{DAG}][\text{F}]} \quad (6-18)$$

$$K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{[\text{F.W}]}{[\text{F}][\text{W}]} \quad (6-19)$$

$$K_4 = \frac{k_4}{k_{-4}} = \frac{[E][FA]}{[E.FA]} \quad (6-20)$$

$$K_5 = \frac{k_5}{k_{-5}} = \frac{[DAG.E]}{[DAG][E]} \quad (6-21)$$

$$K_6 = \frac{k_6}{k_{-6}} = \frac{[MAG][F]}{[MAG.F]} \quad (6-22)$$

$$K_A = \frac{k_A}{k_{-A}} = \frac{[DAG.F]}{[TAG.E]} \quad (6-23)$$

$$K_B = \frac{k_B}{k_{-B}} = \frac{[E.FA]}{[F.W]} \quad (6-24)$$

$$K_C = \frac{k_c}{k_{-c}} = \frac{[MAG.F]}{[DAG.E]} \quad (6-25)$$

$$[TAG]_0 + [DAG]_0 + [MAG]_0 = [TAG] + [DAG] + [MAG] \quad (6-26)$$

$$[FA] = [FA]_0 + ([DAG] - [DAG]_0) + 2([MAG] - [MAG]_0) \quad (6-27)$$

$$[W] = [W_0 - ([FA] - [FA]_0)] \quad (6-28)$$

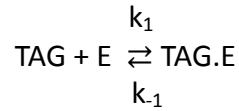
En las siguientes secciones se presentan las expresiones de velocidad de reacción derivadas suponiendo un paso limitante (numerados del 1 al 6 y de la A a la C de acuerdo a la nomenclatura utilizada en la Figura 6.7.) y las restantes ocho etapas en estado de rápido equilibrio.

Para cada modelo se presenta la expresión de la velocidad de reacción correspondiente al paso limitante, obviándose las restantes cuatro ecuaciones diferenciales necesarias para realizar el ajuste de los datos experimentales correspondientes a la totalidad de las especies. Tres de ellas se derivan de los balances molares dados por las Ec. (6-26) a (6-28), mientras que la cuarta resulta de manipular algebraicamente ciertas relaciones de equilibrio. En cada caso es posible obtener una relación entre concentraciones de especies libres y diferentes conjuntos de constantes de equilibrio.

En todos los casos las velocidades máximas se denotan por  $v_{m\acute{a}x}$ , las constantes de equilibrio por  $K_i$  y los parámetros cinéticos por  $C_i$ .

#### 6.3.2.1.1.1. PASO LIMITANTE 1

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 1:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global está dada por la Ec. (6-29).

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1[\text{W}] + C_2 [\text{DAG}][\text{W}] + C_3 [\text{MAG}][\text{FA}] + C_4 [\text{FA}][\text{W}] + [\text{DAG}][\text{FA}] + C_5 [\text{FA}]} \quad (6-29)$$

Donde:

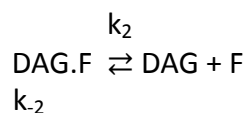
$$v_{\text{máx},f} = k_1 \frac{K_2 K_3 K_4 K_B}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} [E]_T \quad v_{\text{máx},r} = k_{-1} \frac{1}{K_A \left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} [E]_T$$

$$C_1 = \frac{K_2 K_3 K_4 K_B}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} \quad C_2 = \frac{K_2 K_3 K_4 K_5 K_B}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} \quad C_3 = \frac{K_2}{K_6 \left(1 + \frac{1}{K_A}\right)}$$

$$C_4 = \frac{K_2 K_3 K_B \left(1 + \frac{1}{K_B}\right)}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} \quad C_5 = \frac{K_2}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)}$$

#### 6.3.2.1.1.2. PASO LIMITANTE 2

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 2:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-30).

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] - v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1 [\text{W}] + C_2 [\text{DAG}][\text{W}] + C_3 [\text{FA}][\text{W}] + [\text{TAG}][\text{W}] + C_4 [\text{FA}]} \quad (6-30)$$

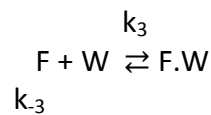
Con:

$$v_{\text{máx},f} = k_2 \frac{K_1 K_A}{K_1 (1 + K_A)} [E]_T \quad v_{\text{máx},r} = k_{-2} \frac{1}{K_1 K_3 K_4 K_B (1 + K_A)} [E]_T \quad C_1 = \frac{1}{K_1 (1 + K_A)}$$

$$C_2 = \frac{K_5 (1 + K_C)}{K_1 (1 + K_A)} \quad C_3 = \frac{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)}{K_1 K_4 (1 + K_A)} \quad C_4 = \frac{1}{K_1 K_3 K_4 K_B (1 + K_A)}$$

#### 6.3.2.1.1.3. PASO LIMITANTE 3

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 3:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-31).

$$\frac{d[\text{W}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1 [\text{DAG}] + C_2 [\text{DAG}]^2 + [\text{DAG}][\text{FA}] + C_3 [\text{DAG}][\text{TAG}] + C_4 [\text{TAG}]} \quad (6-31)$$

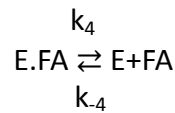
Con:

$$v_{\text{máx},r} = k_{-3} \frac{1}{K_B \left(1 + \frac{1}{K_B}\right)} [E]_T \quad v_{\text{máx},f} = k_3 \frac{K_1 K_2 K_4 K_A}{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)} [E]_T \quad C_1 = \frac{K_4}{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)}$$

$$C_2 = \frac{K_4 K_5 (1 + K_C)}{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)} \quad C_3 = \frac{K_1 K_4 (1 + K_A)}{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)} \quad C_4 = \frac{K_1 K_2 K_4 K_A}{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)}$$

#### 6.3.2.1.1.4. PASO LIMITANTE 4

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 4:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-32).

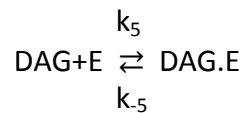
$$\frac{d[\text{FA}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] - v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1[\text{DAG}] + C_2 [\text{DAG}]^2 + [\text{TAG}][\text{W}] + C_3 [\text{TAG}][\text{DAG}] + C_4 [\text{TAG}]} \quad (6-32)$$

Con:

$$\begin{array}{lll}
 v_{\text{máx},f} = k_4 \frac{K_B}{(1+K_B)} [E]_T & v_{\text{máx},r} = k_{-4} \frac{K_2}{K_1 K_3 K_A (1+K_B)} [E]_T & C_1 = \frac{K_2}{K_1 K_3 K_A (1+K_B)} \\
 C_2 = \frac{K_2 K_5 (1+K_A + \frac{1}{K_C})}{K_1 K_3 K_A (1+K_B)} & C_3 = \frac{K_2}{K_3 K_A (1+K_B)} & C_4 = \frac{1}{K_3 (1+K_B)}
 \end{array}$$

#### 6.3.2.1.1.5. PASO LIMITANTE 5

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 5:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-33).

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{DAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{MAG}][\text{FA}]}{C_1[\text{W}] + [\text{MAG}][\text{FA}] + C_2[\text{FA}][\text{W}] + C_3[\text{TAG}][\text{W}] + C_4[\text{FA}]} \quad (6-33)$$

Con:

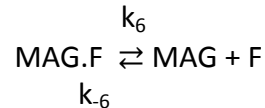
$$\begin{array}{lll}
 v_{\text{máx},f} = k_5 \frac{K_3 K_6 K_B}{K_4 \left(1 + \frac{1}{K_C}\right)} [E]_T & v_{\text{máx},r} = k_{-5} \frac{1}{(1+K_C)} [E]_T & C_1 = \frac{K_3 K_6 K_B}{K_4 \left(1 + \frac{1}{K_C}\right)}
 \end{array}$$



$$C_2 = K_3 K_6 K_B \left(1 + \frac{1}{K_B}\right) \quad C_3 = \frac{K_1 K_3 K_6 K_B (1 + K_A)}{K_4 \left(1 + \frac{1}{K_C}\right)} \quad C_4 = \frac{K_6}{\left(1 + \frac{1}{K_C}\right)}$$

## 6.3.2.1.1.6. PASO LIMITANTE 6

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa 6:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-34).

$$\frac{d[\text{MAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f} [\text{DAG}][\text{W}] - v_{\text{máx},r} [\text{MAG}][\text{FA}]}{C_1[\text{W}] + [\text{DAG}][\text{W}] + C_2[\text{FA}][\text{W}] + C_3[\text{TAG}][\text{W}] + C_4[\text{FA}]} \quad (6-34)$$

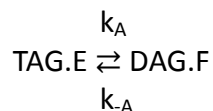
Con:

$$v_{\text{máx},f} = k_6 \frac{K_C}{(1+K_C)} [E]_T \quad v_{\text{máx},r} = k_{-6} \frac{1}{K_3 K_4 K_5 K_B (1+K_C)} [E]_T \quad C_1 = \frac{1}{K_5 (1+K_C)}$$

$$C_2 = \frac{\left(1 + \frac{1}{K_B}\right)}{K_4 K_5 (1+K_C)} \quad C_3 = \frac{K_1 (1+K_A)}{K_5 (1+K_C)} \quad C_4 = \frac{1}{K_3 K_4 K_5 K_B (1+K_C)}$$

## 6.3.2.1.1.7. PASO LIMITANTE A

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa A:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-35).

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1 [\text{W}] + C_2 [\text{DAG}][\text{W}] + C_3 [\text{FA}][\text{W}] + [\text{TAG}][\text{W}] + C_4 [\text{DAG}][\text{FA}] + C_5 [\text{FA}]} \quad (6-35)$$

Con:

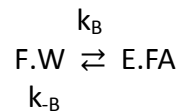
$$v_{\text{máx},f} = -k_A [E]_T \quad v_{\text{máx},r} = k_{-A} \frac{1}{K_1 K_2 K_3 K_A K_B} [E]_T \quad C_1 = \frac{1}{K_1}$$

$$C_2 = \frac{K_5}{K_1} (1 + K_C) \quad C_3 = \frac{1}{K_1 K_4} \left(1 + \frac{1}{K_B}\right) \quad C_4 = \frac{1}{K_1 K_2 K_3 K_4 K_B}$$

$$C_5 = \frac{1}{K_1 K_3 K_4 K_B}$$

#### 6.3.2.1.1.8. PASO LIMITANTE B

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa B:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global estaría dada por la Ec. (6-36).

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] - v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1 [\text{DAG}] + C_2 [\text{DAG}]^2 + [\text{TAG}][\text{W}] + C_3 [\text{DAG}][\text{FA}] + C_4 [\text{TAG}][\text{DAG}] + C_5 [\text{TAG}]} \quad (6-36)$$

Con:

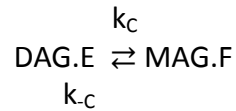
$$v_{\text{máx},f} = k_B [E]_T \quad v_{\text{máx},r} = k_{-B} \frac{K_2 K_4}{K_1 K_3 K_A} [E]_T$$

$$C_1 = \frac{K_2}{K_1 K_3 K_A} \quad C_2 = \frac{K_2 K_5 (1 + K_C)}{K_1 K_3 K_A} \quad C_3 = \frac{K_2 K_4}{K_1 K_3 K_A}$$

$$C_4 = \frac{K_2 (1 + K_A)}{K_3 K_A} \quad C_5 = \frac{1}{K_3}$$

## 6.3.2.1.1.9. PASO LIMITANTE C

La velocidad de reacción vendría dada por la velocidad de la etapa B:



Suponiendo los restantes ocho pasos en condición de rápido equilibrio, la expresión para la velocidad de reacción global vendría dada por la Ec. (6-37).

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{DAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{MAG}][\text{FA}]}{C_1 [\text{W}] + [\text{DAG}][\text{W}] + C_2 [\text{MAG}][\text{FA}] + C_3 [\text{FA}][\text{W}] + C_4 [\text{TAG}][\text{W}] + C_5 [\text{FA}]} \quad (6-37)$$

Con:

$$\begin{aligned} v_{\text{máx},f} &= k_c [E]_T & v_{\text{máx},r} &= k_{-c} \frac{K_4}{K_3 K_5 K_6 K_B} [E]_T \\ C_1 &= \frac{1}{K_5} & C_2 &= \frac{K_4}{K_3 K_5 K_6 K_B} & C_3 &= \frac{K_4}{K_5} \left(1 + \frac{1}{K_B}\right) \\ C_4 &= \frac{K_1}{K_5} (1 + K_A) & C_5 &= \frac{K_4}{K_3 K_5 K_B} \end{aligned}$$

$v_{\text{máx}}$  denota las velocidades máximas,  $K_i$  las constantes de equilibrio y  $C_i$  los parámetros cinéticos involucrados en el modelo.

## 6.3.2.1.2. HIPÓTESIS DE ESTADO ESTACIONARIO

Si se aplica la hipótesis de estado estacionario, se obtienen las siguientes expresiones de velocidad de reacción:

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{C_1 [\text{TAG}][\text{W}] + C_2 [\text{DAG}][\text{FA}] + C_3 [\text{DAG}]^2 - C_4 [\text{TAG}][\text{MAG}]}{\text{denom}} \quad (6-38)$$

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{C_1 [\text{TAG}][\text{W}] + 2C_4 [\text{TAG}][\text{MAG}] + C_5 [\text{MAG}][\text{FA}] - 2C_3 [\text{DAG}]^2}{\text{denom} - \frac{C_2 [\text{DAG}][\text{FA}] - C_6 [\text{DAG}][\text{W}]}{\text{denom}}} \quad (6-39)$$

$$\frac{d[\text{MAG}]}{dt} = \frac{C_3 [\text{DAG}]^2 + C_6 [\text{DAG}][\text{W}] - C_4 [\text{TAG}][\text{MAG}] - C_5 [\text{MAG}][\text{FA}]}{\text{denom}} \quad (6-40)$$

$$\frac{d[\text{FA}]}{dt} = \frac{C_6 [\text{DAG}][\text{W}] + C_1 [\text{TAG}][\text{W}] - C_5 [\text{MAG}][\text{FA}] - C_2 [\text{DAG}][\text{FA}]}{\text{denom}} \quad (6-41)$$

$$\frac{d[\text{W}]}{dt} = - \frac{d[\text{FA}]}{dt} \quad (6-42)$$

Con:

$$\begin{aligned} \text{denom} = & \frac{C_3 C_5}{C_7} [\text{MAG}] + \left( \frac{C_4 C_6}{C_9} + \frac{C_1 C_3}{C_8} \right) [\text{DAG}] + \frac{C_2 C_4}{C_{10}} [\text{TAG}] + \frac{C_1 C_5}{C_9} [\text{FA}] + \frac{C_2 C_6}{C_7} [\text{W}] \\ & + \frac{C_3 C_5}{C_{11}} [\text{DAG}][\text{MAG}] + \frac{C_3 C_5}{C_{11}} [\text{DAG}][\text{MAG}] + C_3 C_{12} [\text{DAG}]^2 + C_4 C_{13} [\text{TAG}][\text{MAG}] \\ & + C_6 C_{14} [\text{DAG}][\text{W}] + C_5 C_{15} [\text{MAG}][\text{FA}] + C_2 C_{16} [\text{DAG}][\text{FA}] \\ & + C_1 C_{17} [\text{TAG}][\text{W}] + \frac{C_2 C_6}{C_{18}} [\text{FA}][\text{W}] + \frac{C_1 C_3}{C_{19}} [\text{TAG}][\text{MAG}] \end{aligned}$$

$$C_1 = k_1 k_2 k_3 k_4 (k_5 + k_6) [E]_T \quad C_2 = k_1 k_2 k_3 k_4 (k_5 + k_6) [E]_T \quad C_3 = k_1 k_2 k_5 k_6 (k_3 + k_4) [E]_T$$

$$C_4 = k_1 k_2 k_5 k_6 (k_3 + k_4) [E]_T \quad C_5 = k_3 k_4 k_5 k_6 (k_1 + k_2) [E]_T \quad C_6 = k_3 k_4 k_5 k_6 (k_1 + k_2) [E]_T$$

$$C_7 = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_8 = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_9 = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_{10} = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_{11} = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_{12} = \frac{(k_1 + k_6)}{k_1 k_6}$$

$$C_{13} = \frac{(k_2 + k_5)}{k_2 k_5}$$

$$C_{14} = \frac{(k_4 + k_6)}{k_4 k_6}$$

$$C_{15} = \frac{(k_3 + k_5)}{k_3 k_5}$$

$$C_{16} = \frac{(k_1 + k_3)}{k_1 k_3}$$

$$C_{17} = \frac{(k_2 + k_4)}{k_2 k_4}$$

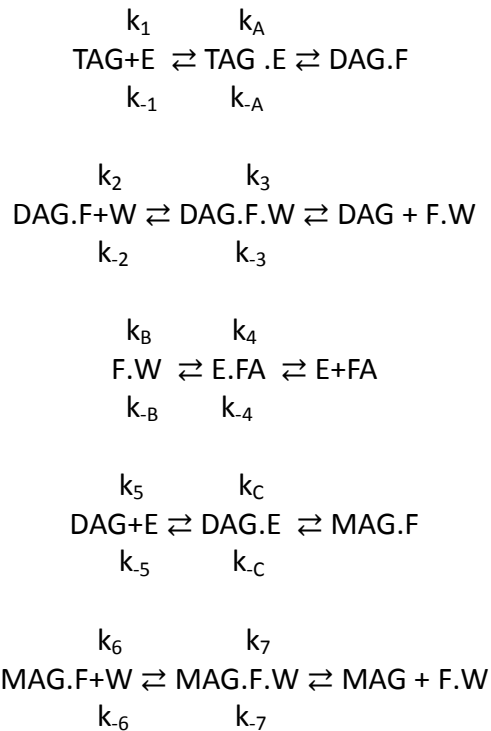
$$C_{18} = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

$$C_{19} = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6$$

En donde los diferentes  $C_i$  definen a los parámetros cinéticos involucrados.

## 6.3.2.2. INGRESO DEL AGUA EN LA ETAPA POSTERIOR A LA ACILACIÓN DE LA ENZIMA

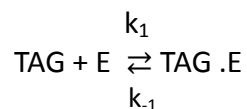
En la Figura 6.8. se presentan las reacciones que ocurrirían en el sistema bajo las condiciones establecidas.



**Figura 6.8.** Esquema de reacciones correspondientes al Mecanismo 2 con el agua ingresando en el paso posterior a la acilación de la enzima.

## 6.3.2.2.1. HIPÓTESIS DE RÁPIDO EQUILIBRIO

Si se considera el siguiente paso como limitante y las relaciones de equilibrio detalladas debajo, es posible deducir la correspondiente expresión para la velocidad de reacción.



$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{TAG} \cdot \text{E}]}{[\text{TAG}][\text{E}]} \quad (6-43)$$

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[\text{DAG.F.W}]}{[\text{DAG.F}][\text{W}]} \quad (6-44)$$

$$K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{[\text{DAG}][\text{F.W}]}{[\text{DAG.F.W}]} \quad (6-45)$$

$$K_4 = \frac{k_4}{k_{-4}} = \frac{[\text{E}][\text{FA}]}{[\text{E.FA}]} \quad (6-46)$$

$$K_5 = \frac{k_5}{k_{-5}} = \frac{[\text{DAG.E}]}{[\text{DAG}][\text{E}]} \quad (6-47)$$

$$K_6 = \frac{k_6}{k_{-6}} = \frac{[\text{MAG.F.W}]}{[\text{MAG.F}][\text{W}]} \quad (6-48)$$

$$K_7 = \frac{k_7}{k_{-7}} = \frac{[\text{MAG}][\text{F.W}]}{[\text{MAG.F.W}]} \quad (6-49)$$

$$K_A = \frac{k_A}{k_{-A}} = \frac{[\text{DAG.F}]}{[\text{TAG.E}]} \quad (6-50)$$

$$K_B = \frac{k_B}{k_{-B}} = \frac{[\text{E.FA}]}{[\text{F.W}]} \quad (6-51)$$

$$K_C = \frac{k_C}{k_{-C}} = \frac{[\text{MAG.F}]}{[\text{DAG.E}]} \quad (6-52)$$

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{-v_{\text{máx},f} [\text{TAG}][\text{W}] + v_{\text{máx},r} [\text{DAG}][\text{FA}]}{C_1[\text{W}] + C_2[\text{DAG}][\text{FA}] + C_3[\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}] + C_4[\text{FA}][\text{W}] + C_5[\text{DAG}][\text{W}] + C_6[\text{DAG}][\text{W}]^2} \quad (6-53)$$

Con:

$$v_{\text{máx},f} = k_1 [E]_T$$

$$v_{\text{máx},r} = k_{-1} [E]_T$$

$$C_1 = K_2 K_3 K_4 K_A K_B$$

$$C_2 = (1 + K_A)$$

$$C_3 = K_2 K_A$$

$$C_4 = K_2 K_3 (1 + K_B)$$

$$C_5 = K_2 K_3 K_4 K_5 K_A K_B (1 + K_C)$$

$$C_6 = K_2 K_3 K_4 K_5 K_6 K_A K_B K_C (1 + K_C)$$

### 6.3.2.2.2. HIPÓTESIS DE ESTADO ESTACIONARIO

Aplicando la hipótesis de estado estacionario se obtienen las siguientes expresiones:

$$\frac{d[\text{TAG}]}{dt} = \frac{C_1 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}] + C_2 [E]_T [\text{DAG}]^2[\text{W}] + C_3 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}]}{\text{denom}} - \frac{C_4 [E]_T [\text{MAG}][\text{TAG}][\text{W}] - C_5 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}]^2 - C_6 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}]}{\text{denom}} \quad (6-54)$$

$$\frac{d[\text{DAG}]}{dt} = \frac{C_6 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}] + C_5 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}]^2 + 2C_4 [E]_T [\text{MAG}][\text{TAG}][\text{W}]}{\text{denom}} - \frac{C_1 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}] - 2C_2 [E]_T [\text{DAG}]^2[\text{W}] - C_3 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}]}{\text{denom}} - \frac{C_7 [E]_T [\text{DAG}][\text{W}] + C_8 [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}] + C_9 [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}][\text{W}]}{\text{denom}} + \frac{C_{10} [E]_T [\text{DAG}][\text{W}]^2}{\text{denom}} \quad (6-55)$$

$$\frac{d[\text{MAG}]}{dt} = \frac{C_2 [E]_T [\text{DAG}]^2[\text{W}] + C_7 [E]_T [\text{DAG}][\text{W}] + C_{10} [E]_T [\text{DAG}][\text{W}]^2}{\text{denom}} - \frac{C_4 [E]_T [\text{MAG}][\text{TAG}][\text{W}] - C_{11} [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}] - C_9 [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}][\text{W}]}{\text{denom}} \quad (6-56)$$

$$\frac{d[\text{FA}]}{dt} = \frac{C_7 [E]_T [\text{DAG}][\text{W}] + C_6 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}] + C_5 [E]_T [\text{TAG}][\text{W}]^2}{\text{denom}} + \frac{C_{10} [E]_T [\text{DAG}][\text{W}]^2 - C_3 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}] - C_9 [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}][\text{W}]}{\text{denom}} - \frac{C_1 [E]_T [\text{DAG}][\text{FA}] - C_{11} [E]_T [\text{MAG}][\text{FA}]}{\text{denom}} \quad (6-57)$$

$$\frac{d[\text{W}]}{dt} = - \frac{d[\text{FA}]}{dt} \quad (6-58)$$

Con:

$$\begin{aligned} \text{denom} = & C_{12}[\text{MAG}] + C_{13}[\text{DAG}] + C_{14}[\text{TAG}] + C_{15}[\text{DAG}][\text{MAG}] + \\ & + C_{16}[\text{MAG}][\text{FA}] + C_{17}[\text{TAG}][\text{MAG}] + C_{18}[\text{DAG}][\text{W}] + C_{19}[\text{DAG}]^2 + \\ & + C_{20}[\text{DAG}][\text{FA}] + C_{21}[\text{TAG}][\text{DAG}] + C_{22}[\text{TAG}][\text{W}] + C_{23}[\text{W}] + C_{24}[\text{TAG}][\text{MAG}][\text{W}] + \\ & + C_{25}[\text{TAG}][\text{DAG}][\text{W}] + C_{26}[\text{TAG}][\text{W}]^2 + C_{27}[\text{DAG}][\text{MAG}][\text{W}] + \\ & + C_{28}[\text{MAG}][\text{FA}][\text{W}] + C_{29}[\text{DAG}]^2[\text{W}] + C_{30}[\text{DAG}][\text{W}]^2 + C_{31}[\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}] + \\ & + C_{32}[\text{TAG}][\text{MAG}][\text{W}]^2 + C_{33}[\text{DAG}][\text{MAG}][\text{W}]^2 + C_{34}[\text{MAG}][\text{FA}][\text{W}]^2 + \\ & + C_{35}[\text{TAG}][\text{DAG}][\text{W}]^2 + C_{36}[\text{DAG}]^2[\text{W}]^2 + C_{37}[\text{DAG}][\text{FA}][\text{W}]^2 + \\ & + C_{38}[\text{W}]^2 + C_{39}[\text{MAG}][\text{W}] + C_{40}[\text{FA}][\text{W}] + C_{41}[\text{FA}] + C_{42}[\text{FA}][\text{W}]^2 + C_{43} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} C_1 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 (k_6 + k_7) & C_2 &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 k_7 & C_3 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_6 k_7 \\ C_4 &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 k_7 & C_5 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_6 k_7 & C_6 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 (k_6 + k_7) \\ C_7 &= k_1 k_4 k_5 k_6 k_7 (k_2 + k_3) & C_8 &= k_1 k_4 k_5 k_6 k_7 (k_2 + k_3) & C_9 &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 k_7 \\ C_{10} &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 k_7 & C_{11} &= k_1 k_4 k_5 k_6 k_7 (k_2 + k_3) & C_{12} &= k_1 k_5 k_6 k_7 (k_2 + k_3) \\ C_{13} &= k_1 [k_2 k_3 k_5 (k_6 + k_7) + k_4 k_5 (k_2 + k_3) (k_6 + k_7)] \\ C_{14} &= k_1 k_4 k_5 (k_2 + k_3) (k_6 + k_7) & C_{15} &= k_1 k_6 k_7 k_5 (k_2 + k_3) \\ C_{16} &= k_1 k_4 k_7 (k_5 + k_6) (k_2 + k_3) & C_{17} &= k_5 k_6 k_7 k_1 (k_2 + k_3) \\ C_{18} &= k_1 k_6 [k_2 k_7 (k_3 + k_5) + k_4 k_5 (k_2 + k_3) + k_3 k_5 k_7] \\ C_{19} &= k_1 k_2 k_3 k_5 (k_6 + k_7) & C_{20} &= k_3 k_4 k_5 (k_1 + k_2) (k_6 + k_7) \\ C_{21} &= k_1 k_2 k_3 k_5 (k_6 + k_7) \\ C_{22} &= k_1 [k_4 k_6 k_7 (k_2 + k_3) + k_2 k_5 (k_3 + k_4) + (k_6 + k_7)] \\ C_{23} &= k_4 [k_2 k_3 k_5 (k_6 + k_7) + k_1 k_6 k_7 (k_2 + k_3)] \\ C_{24} &= [k_1 k_2 k_5 k_6 k_7 + k_1 k_2 k_3 k_7 (k_5 + k_6)] \\ C_{25} &= k_3 k_1 [k_2 k_6 k_7 + k_5 k_2 (k_6 + k_7)] & C_{26} &= k_1 k_2 k_6 k_7 (k_3 + k_4) \\ C_{27} &= k_7 k_5 [k_6 k_2 k_3 + k_1 k_6 (k_2 + k_3)] & C_{28} &= k_4 k_7 [k_1 k_6 (k_2 + k_3) + (k_5 + k_6) k_2 k_3] \\ C_{29} &= k_3 k_5 k_6 [k_2 k_7 + k_1 (k_2 + k_7)] & C_{30} &= k_2 k_3 k_5 k_6 (k_4 + k_7) \\ C_{31} &= k_3 k_4 \{ [k_7 k_6 (k_1 + k_2) + k_5 k_2 k_7] + k_5 k_6 k_2 \} \\ C_{32} &= k_7 k_1 k_2 k_3 k_6 & C_{33} &= k_7 k_2 k_3 k_5 k_6 \\ C_{34} &= k_4 k_7 k_2 k_3 k_6 & C_{35} &= k_3 k_1 k_2 k_6 k_7 & C_{36} &= k_3 k_2 k_5 k_6 k_7 \\ C_{37} &= k_3 k_4 k_2 k_6 k_7 & C_{38} &= k_2 k_3 k_4 k_6 k_7 & C_{39} &= k_5 k_6 k_7 k_2 k_3 \\ C_{40} &= k_4 \{ k_5 k_2 k_3 (k_6 + k_7) + k_1 k_6 k_7 (k_2 + k_3) \} & C_{41} &= k_1 \{ k_4 k_5 (k_6 + k_7) (k_2 + k_3) \} \\ C_{42} &= k_4 k_2 k_3 k_6 k_7 & C_{43} &= k_1 k_5 k_4 (k_6 + k_7) (k_2 + k_3) \end{aligned}$$

En donde  $C_i$  define a los parámetros cinéticos del modelo.



En este caso el número de parámetros cinéticos a determinar resulta también excesivo, resultando muy complejo el ajuste de los datos experimentales al modelo.

## 6.4. MÉTODO DE RESOLUCIÓN

El ajuste de los datos experimentales se llevó a cabo mediante rutinas de regresión no lineal, haciendo uso de los métodos de Runge-Kutta de cuarto orden y de mínimos cuadrados, implementadas en lenguaje FORTRAN. Las mismas fueron desarrolladas originalmente por el Dr. García Alvarado, perteneciente al Instituto Tecnológico de Veracruz y con quien se mantiene una colaboración, e implementadas localmente para la presente tesis.

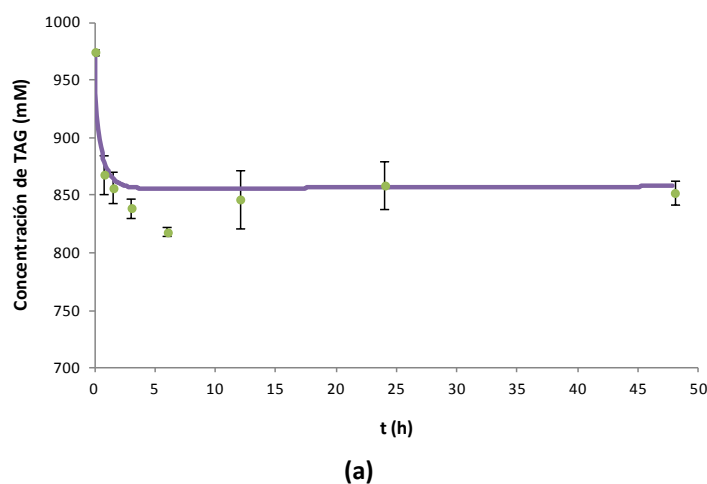
## 6.5. RESULTADOS

De manera previa a presentar los resultados de los correspondientes ajustes de datos es necesario realizar una aclaración respecto al contenido de agua inicial del sistema. Reyes y Hill Jr (1994) encontraron que, en reacciones de acidólisis, el contenido inicial de agua estimado (calculado en base a los aportes por parte de los sustratos y biocatalizadores) resultó ser inferior al calculado teóricamente en función de los niveles de hidrólisis observados al finalizar la reacción. Dichos autores propusieron que la diferencia podría deberse a la absorción de humedad ambiente por parte del medio de reacción al realizar la toma de muestra. En consecuencia, los mismos sugirieron considerar a la concentración inicial de agua como un parámetro adicional a incorporar al modelo. Los resultados que obtuvieron aplicando dicha consideración resultaron encontrarse en concordancia con los obtenidos al realizar los correspondientes balances molares. Las reacciones llevadas a cabo en la presente tesis para obtener los datos correspondientes a cada tiempo se realizaron en forma independiente, con lo cual los productos no continuaban reaccionando luego de la toma de muestra. Sin embargo, teniendo en cuenta la sensibilidad del sistema al

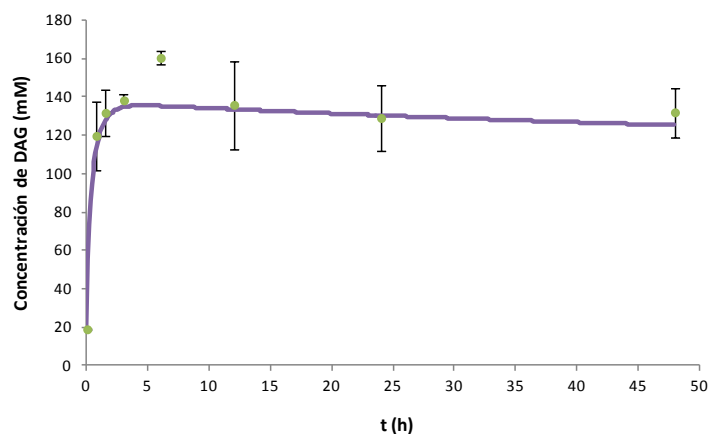
contenido de agua, y la posibilidad de que ésta sea absorbida durante la preparación de la mezcla inicial de reacción, se consideró conveniente aplicar aquí dicha práctica.

### 6.5.1. MECANISMO 1

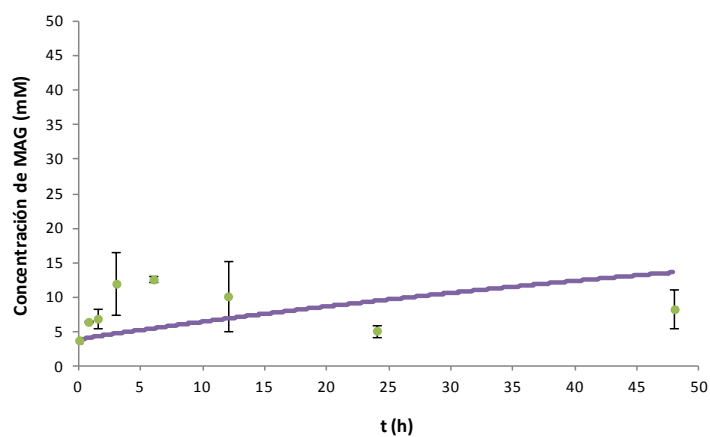
En la Figura 6.9. se presentan los resultados obtenidos al ajustar a las Ec. (6-1) a (6-5) los datos experimentales correspondientes a las reacciones llevadas a cabo con Lipozyme RM IM, una concentración de enzima de 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) y una relación de sustratos SO:FHSO de 50:50 (% m/m). Se puede observar la incapacidad del modelo para representar adecuadamente ciertas zonas de los perfiles obtenidos, en particular la correspondiente a los máximos y mínimos relativos en la concentración de las especies. Tanto las velocidades iniciales como los estados de equilibrio fueron representados satisfactoriamente para los compuestos de mayor concentración, mientras que a tiempos intermedios los valores predichos por este modelo se alejaron apreciablemente de los datos experimentales, lo cual se evidencia en la significancia estadística del parámetro falta de ajuste (Valor  $P < 0.05$ ).



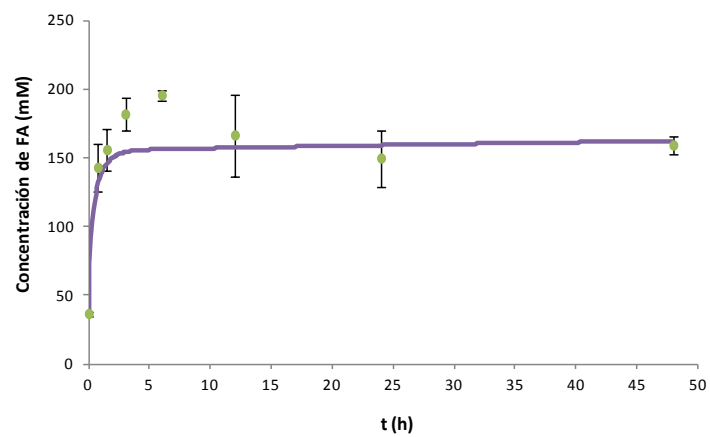
**Figura 6.9.** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.1.1. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% ( $m/m_{\text{sust.}}$ ) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.



(b)



(c)



(d)

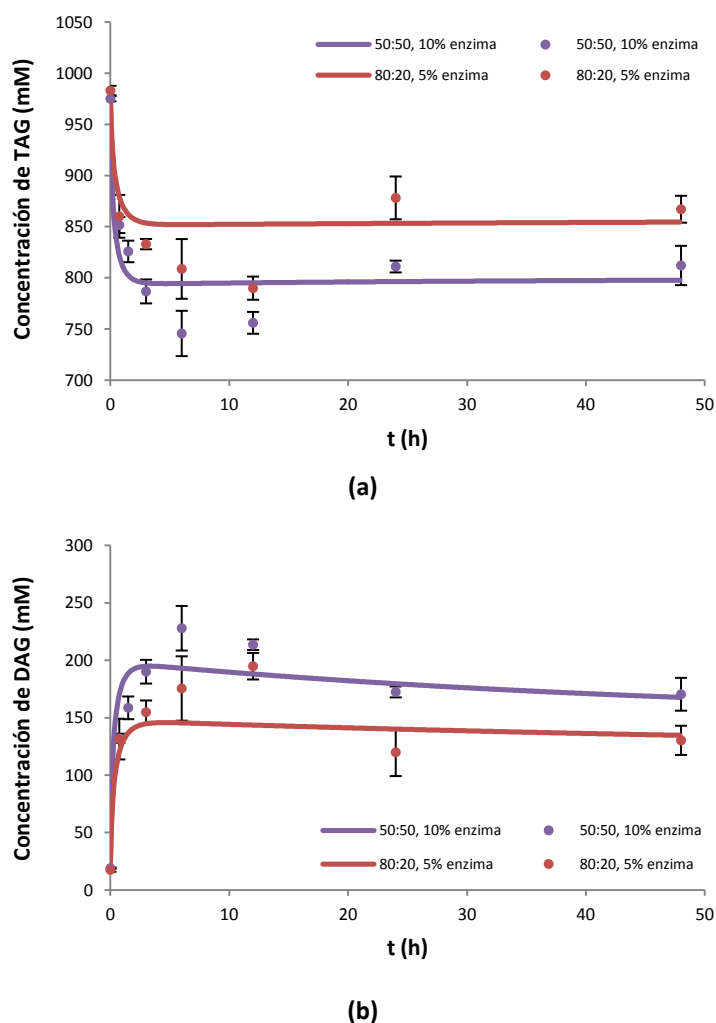
**Figura 6.9. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.1.1. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.

La utilidad de un modelo cinético no sólo está dada por su capacidad para ajustar un conjunto de datos experimentales, sino también por brindar un set

realista de parámetros que permitan predecir el efecto de las variables y el comportamiento bajo diferentes condiciones. En este caso, las constantes obtenidas al ajustar el modelo con los datos correspondientes a un 5% de enzima y una relación de sustratos 50:50 (Tabla 6.1.), se utilizaron para obtener las predicciones del modelo al utilizar, por un lado, una concentración de enzima del 10% y, por otro, una relación de sustratos 80:20. Para el primer caso, se duplicaron los valores correspondientes a los parámetros de ajuste que representan las velocidades máximas en el modelo, los cuales resultan linealmente dependientes de la concentración de enzima total (apartado 6.3.1.1.), mientras que el parámetro correspondiente al contenido inicial de agua en el sistema se aumentó de manera aproximadamente proporcional al aumento en la concentración de enzima. En la Figura 6.10. se muestra la predicción de la evolución de los TAG y DAG bajo estas condiciones.

**Tabla 6.1.** Parámetros de ajuste del modelo representado por las Ec. (6-1) a (6-5).

Parámetro	Valor
$v_{m\acute{a}x,f}^{TAG}$ (mM/h)	771.55
$v_{m\acute{a}x,r}^{TAG}$ (mM/h)	60.76
$v_{m\acute{a}x,f}^{MAG}$ (mM/h)	4.71
$v_{m\acute{a}x,r}^{MAG}$ (mM/h)	3.81
$K_M^{TAG}$ (mM)	299.39
$K_M^{MAG}$ (mM)	15.30
$K_{i,DAG}^{hid}$ (mM)	42.55
$K_{i,DAG}^{est}$ (mM)	5.00
$[H_2O]_0$ (mM)	265.27

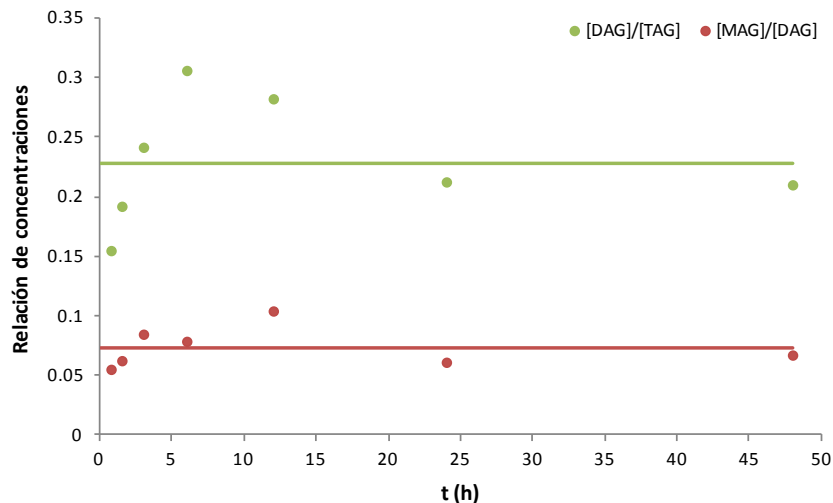


**Figura 6.10.** Comparación de las predicciones del modelo (Mecanismo 1 - Especies agrupadas, ajustado a datos con una relación SO:FHSO de 50:50 y 5% de enzima) con resultados experimentales en diferentes condiciones. (a) TAG y (b) DAG.

Puede observarse la limitada capacidad predictiva del modelo, ya que, si bien predice cualitativamente la tendencia del efecto de los cambios en la concentración de enzima y la relación de sustratos, ninguna de las curvas obtenidas fue capaz de representar de forma razonable los datos experimentales. En el caso de los datos con diferente relación inicial de sustratos la discrepancia puede estar dada no sólo por la calidad de la predicción lograda por el modelo, sino por mecanismos no contemplados en el mismo, como podría ser una posible especificidad de sustrato por parte de la enzima, o diferencias en las velocidades de acil migración de los diferentes ácidos grasos.

### 6.5.2. MECANISMO 2

En la Figura 6.11. se presentan los datos experimentales utilizados para ajustar los modelos (correspondientes a las reacciones llevadas a cabo con Lipozyme RM IM, una concentración de enzima de 5% (m/m<sub>sust.</sub>) y una relación de sustratos SO:FHSO de 50:50 (% m/m)), expresados en concentraciones relativas para visualizar el comportamiento general de las dos reacciones principales esquematizadas en la Figura 6.1. Puede observarse que la relación  $[DAG]/[TAG]$  se incrementa rápidamente al principio de la reacción, alcanza un máximo y luego tiende asintóticamente al valor de equilibrio, indicando que en esta etapa la velocidad de hidrólisis de TAG es mayor que la velocidad de esterificación de DAG. Por otra parte, la relación  $[MAG]/[DAG]$  se mantiene aproximadamente constante (dentro del error experimental producido al determinar tan bajas concentraciones de MAG), sugiriendo que las reacciones de hidrólisis de DAG y esterificación de MAG se mantienen alrededor del equilibrio y no parece ser la etapa limitante de la reacción global.



**Figura 6.11.** Relación de concentraciones de glicéridos. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 10% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. Las líneas representan los valores promedio de las correspondientes relaciones para los productos de reacción.

En consecuencia, se descartó la posibilidad de considerar a las etapas asociadas a la producción de MAG, denominadas 5, 6 y C (Figura 6.7.), como limitantes.

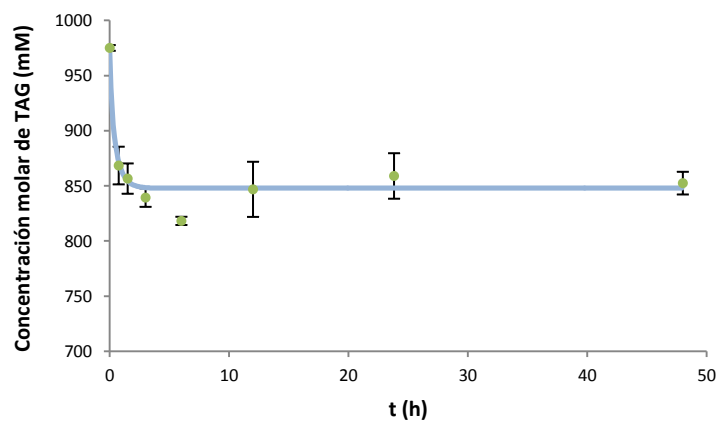
Se comenzó planteando como etapas limitantes a las de isomerización de los complejos enzimáticos, es decir los centrales del esquema representado por la Figura 6.7. En las Figuras 6.11. y 6.12. se presentan los resultados correspondientes a los ajustes según los modelos desarrollados en las secciones 6.3.2.1.1.7. y 6.3.2.1.1.8.

Puede observarse que, de los dos casos analizados, el correspondiente a la suposición de etapa limitante A representaría de manera más adecuada los datos experimentales, dejando en evidencia que el control del sistema de reacción lo poseería la hidrólisis de TAG y la esterificación de DAG. Sin embargo, al igual que en el caso del Mecanismo 1, el modelo no puede representar los máximos y mínimos relativos que se observan en la concentración de las especies. Los parámetros obtenidos para dicho ajuste se presentan en la Tabla 6.2.

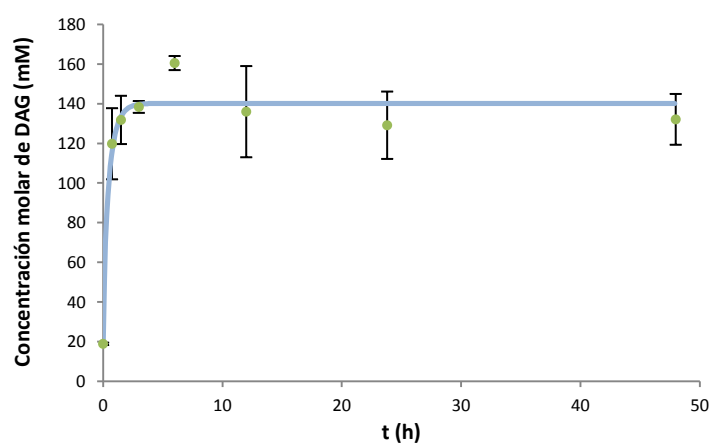
En el caso B se observa una sobreestimación de la producción de MAG, subestimando la de DAG, sin lograr así reproducir la disminución en la concentración de TAG. Si éste fuera el paso limitante, el equilibrio del paso B estaría desplazado hacia la liberación del ácido graso. De esta manera, la enzima quedaría disponible para continuar con la hidrólisis preferencial de los DAG.

**Tabla 6.2.** Parámetros de ajuste del modelo representado por la Ec. (6-36).

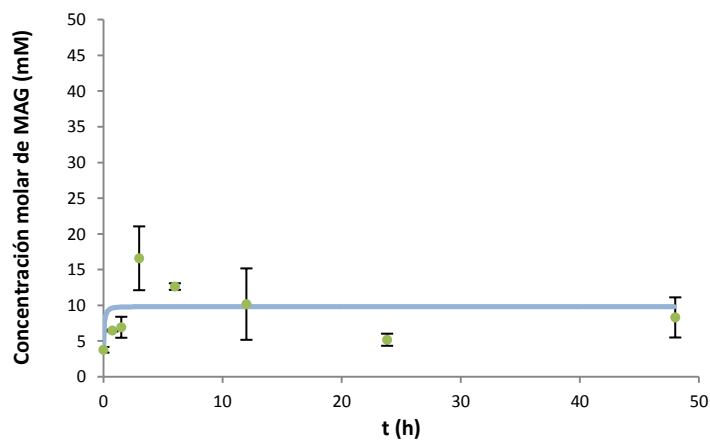
Parámetro	Valor
$v_{\text{máx},f}^{\text{TAG}}$ (mM/h)	1904.50
$v_{\text{máx},r}^{\text{TAG}}$ (mM/h)	54917.00
$C_1$ (mM)	103.79
$C_2$	88.41
$C_3$	9.22
$C_4$	1.87
$C_5$ (mM)	0.84
$[\text{H}_2\text{O}]_0$ (mM)	939.46



(a)



(b)

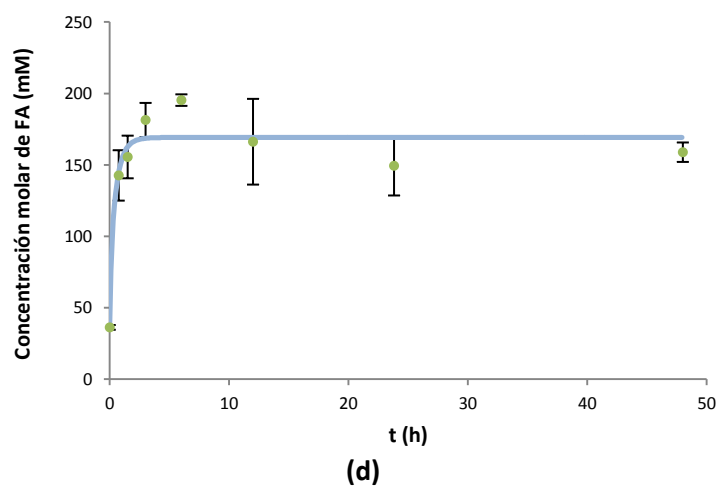


(c)

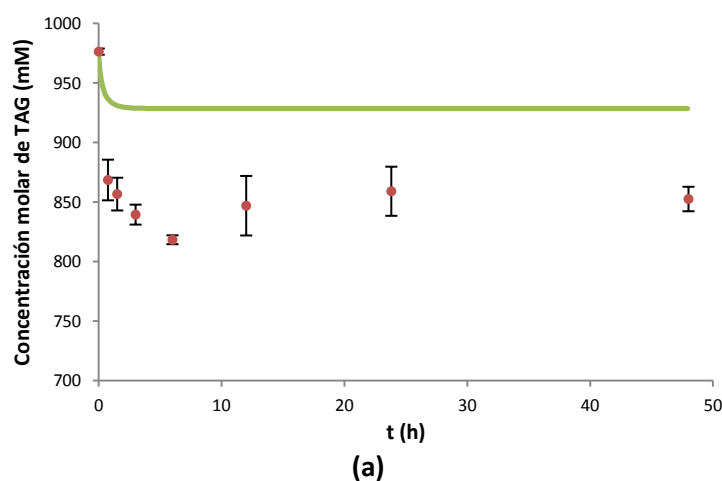
**Figura 6.12.** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.7.

Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.

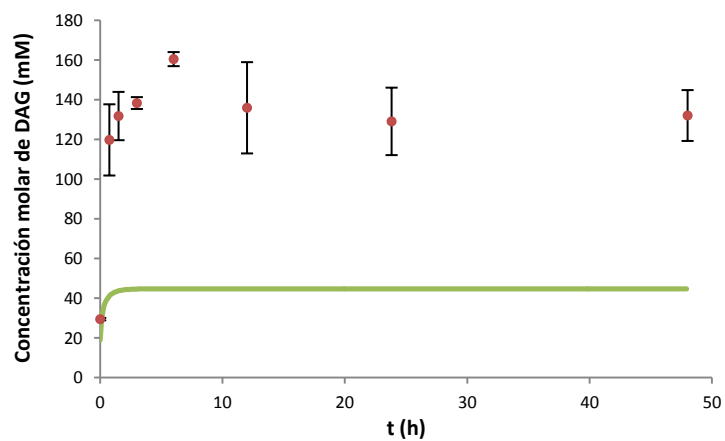




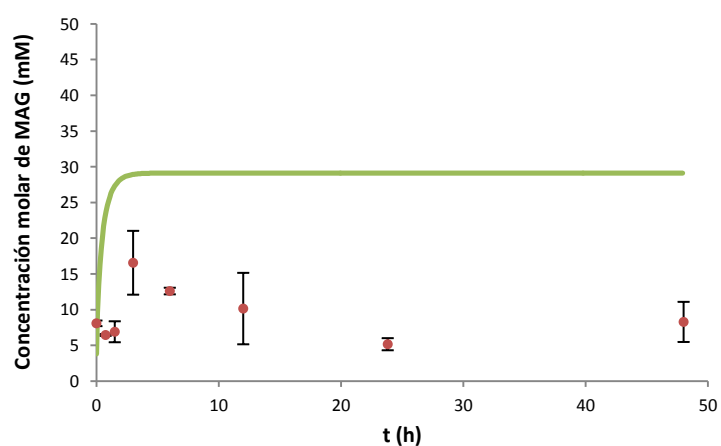
**Figura 6.12. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.7. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.



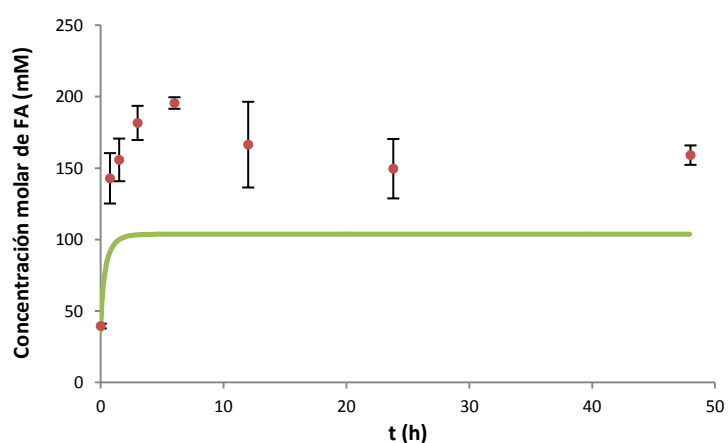
**Figura 6.13.** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.8. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FFA.



(b)



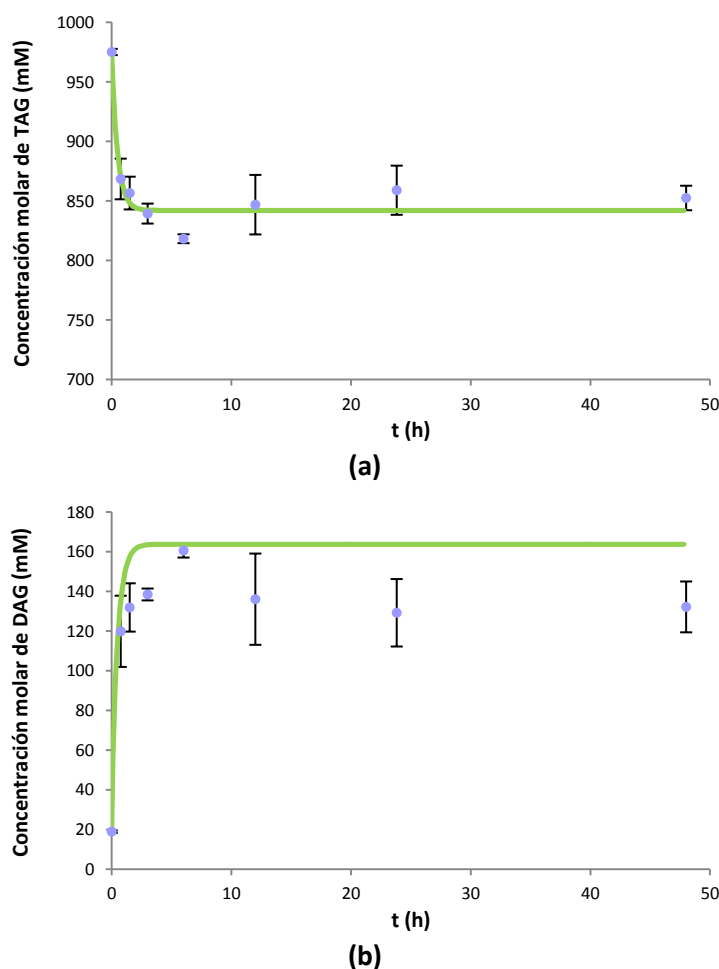
(c)



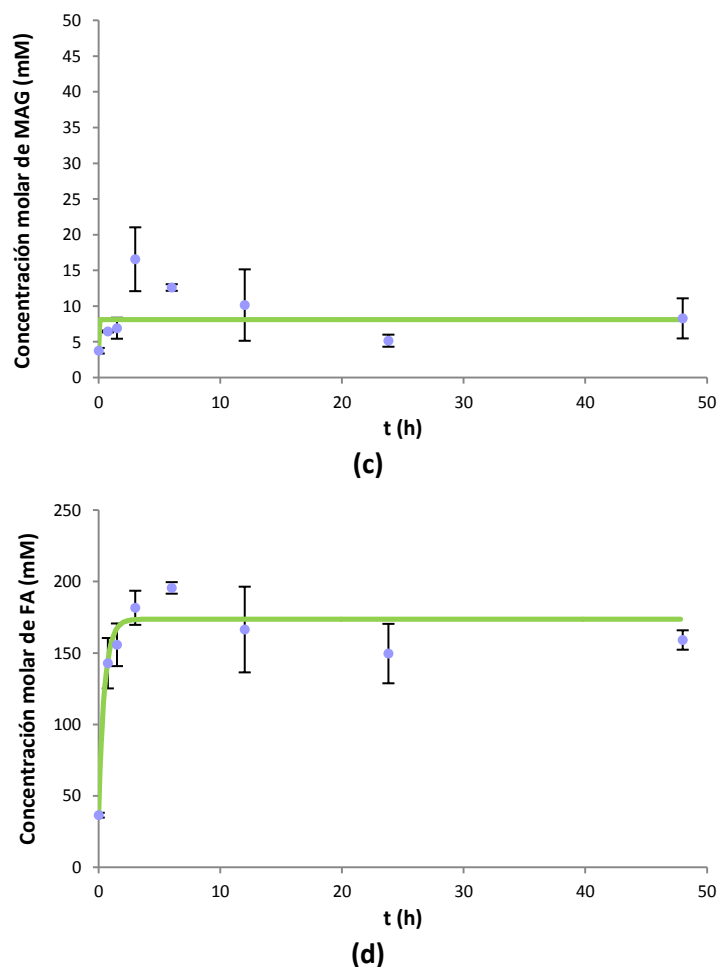
(d)

**Figura 6.13. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.8. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.

En función de los resultados presentados, se planteó continuar el análisis focalizándolo en las etapas de hidrólisis de TAG y esterificación de DAG, en las cuales se encuentran involucrados los pasos 1 y 2. El primero de ellos no fue considerado como probable paso limitante ya que se demostró que inicialmente la hidrólisis se encuentra fuertemente favorecida. Los resultados obtenidos al considerar al paso 2 como etapa limitante de la reacción global se presentan en la Figura 6.13. Puede observarse que el ajuste obtenido resulta similar al correspondiente al suponer limitante el paso A, aunque este último predice mejor la evolución de los DAG en el tiempo.



**Figura 6.14.** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.2. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.



**Figura 6.14. (cont.)** Perfiles de concentración en el tiempo: datos experimentales y ajustados según el modelo presentado en la sección 6.3.2.1.1.2. Condiciones de reacción: 50:50 (SO:FHSO, % m/m), 5% (m/m<sub>sust.</sub>) de Lipozyme RM IM, 70°C, 230 rpm. (a) TAG, (b) DAG, (c) MAG y (d) FA.

La totalidad de los modelos utilizados para el ajuste de los datos experimentales resultaron poseer falta de ajuste. Si bien la predicción del modelo correspondiente al Mecanismo 1 mostró cierta tendencia a representar el máximo en la concentración de DAG, y en general los estados de equilibrio para las especies mayoritarias, esto no fue suficiente para lograr las formas satisfactoriamente.

Esta discrepancia general encontrada en la representación de los datos experimentales por parte de modelos derivados puramente de mecanismos enzimáticos podría explicarse por el hecho de no haber contemplado la existencia de un mecanismo químico actuando en paralelo. En el Capítulo 5 se evidenció experimentalmente la ocurrencia de la reacción de acil migración.

Rodrigues y Fernandez-Lafuente (2010) aseguran que dicho fenómeno debe tenerse en cuenta en cualquier modelo cinético de modificación enzimática de lípidos. Los autores indican que la aceleración de la migración puede no controlarse y este fenómeno químico puede explicar muchos de los resultados obtenidos.

Por lo tanto, es probable que la predicción de los máximos y mínimos observados en las curvas de concentración de los diferentes compuestos, así como también la modificación del perfil ácido en la posición *sn*-2 del glicerol, pueda ser mejorada si se incluye el efecto de la mencionada reacción química en alguno de los mecanismos enzimáticos propuestos.

## 6.6. CONCLUSIONES

Se desarrollaron diferentes modelos teóricos para representar la variación de las concentraciones de TAG, DAG, MAG, FA y agua, que tienen en cuenta las reacciones de hidrólisis y de reesterificación, utilizando dos enfoques: rápido equilibrio y estado estacionario. También se consideraron diferentes formas de complejación de la enzima con los compuestos involucrados en la reacción, ya sea modificando su estructura acilándose, o manteniendo invariante la misma. Estos modelos involucran el conocimiento de un número considerable de parámetros cinéticos y de equilibrio.

Por otra parte, se desarrolló un modelo considerando la distribución de los ácidos grasos saturados (S) e insaturados (U) en los distintos glicéridos (SSS, SUS, UUS, UUU, SS, US, UU, MS y MU) y FA (S y U).

Los modelos más simples no pudieron representar satisfactoriamente el comportamiento cinético del sistema en estudio, en particular los mínimos y máximos relativos observados en la concentración de las especies. Los modelos que involucran mayor número de parámetros no pudieron ser ajustados debido a la restricción implícita de la cantidad de datos necesarios para lograr un ajuste con significancia estadística y a la complejidad del ajuste.

Debido a la incapacidad de los modelos desarrollados para reproducir las formas de los perfiles de los distintos compuestos, se postuló la hipótesis de que la acil migración, fenómeno químico, pueda estar modificando el comportamiento puramente enzimático del sistema, planteando la necesidad de incluir este mecanismo en la derivación de los modelos planteados a partir de consideraciones exclusivamente enzimáticas.

## 6.7. NOMENCLATURA

La nomenclatura referida a los parámetros cinéticos y de equilibrio involucrados en los modelos se detallan al presentar cada uno de ellos. No se listan en la presente sección debido a la utilización de la misma simbología en diferentes modelos para definir distintos tipos de parámetros.

DAG: diglicérido.

E: enzima.

F: enzima acilada.

FA: ácido graso.

FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.

MAG: monoglicérido.

MS: monoglicérido saturado.

MU: monoglicérido insaturado.

SO: aceite de soja refinado.

SS: diglicérido disaturado.

SSS: TAG trisaturado.

SUS: TAG disaturado/monoinsaturado.

TAG: triglicérido.

US: diglicérido monosaturado/monoinsaturado.

UU: diglicérido diinsaturado.

UUS: TAG monosaturado/diinsaturado.

UUU: TAG triinsaturado.

W: agua.

## 6.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Briggs, G.E. y J.B. Haldane (1925). *A Note on the Kinetics of Enzyme Action*. Biochemical Journal. 19(2):338-9.
- Camacho, F.; A. Robles; B. Camacho; P. A. González; L. Esteban y E. Molina (2007). *Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor*. Chemical Engineering Science. 62(12):3127-3141.
- Cheirsilp, B.; W. Kaewthong y A. H-Kittikun (2007). *Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase*. Biochemical Engineering Journal. 35(1):71-80.
- King, E. L. y C. Altman (1956). *A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions*. The Journal of Physical Chemistry. 60:1375-1378.
- Kuby, S. A. (2000). *A study of enzymes. Enzyme catalysis, kinetics and substrate binding*. Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- Magalhães, S. P.; P. W. C. Falcão; L. S. C. Nogueira y F. L. P. Pessoa (2010). *The synthesis of biodiesel via enzymatic ethanolysis of sunflower and palm oils: Kinetic modeling*. Chemical Engineering Transactions. 20:37-42.
- Miller, D.A.; J.M. Prausnitz y H.W. Blanch (1991). *Kinetics of lipase-catalyzed interesterification of triglycerides in cyclohexane*. Enzyme and Microbial Technology. 13: 98-103.
- Ortega, J.; A. López-Hernandez; H. S. Garcia y C. G. Hill Jr (2004). *Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid*. Journal of Food Science. 69(1):FEP1-FEP6.
- Paiva, A. L.; V. M. Balcão y F. X. Malcata (2000). *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. Enzyme and Microbial Technology. 27(3-5):187-204.
- Pessoa, F. L. P.; S. P. Magalhães y P. W. C. Falcão (2009). *Kinetic study of biodiesel production by enzymatic transesterification of vegetable oils*. Computer Aided Chemical Engineering. 27(C):1809-1814.
- Reyes, H. R. y C. G. Hill Jr (1994). *Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase*. Biotechnology and Bioengineering. 43(2):171-182.
- Rodrigues, R. C. y R. Fernandez-Lafuente (2010). *Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 66(1-2):15-32.
- Romero, M.D.; L. Calvo; C. Alba y A. Daneshfar (2007). *A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane*. Journal of Biotechnology. 127(2):269-277.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme kinetics*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Voll, F.; R. L. Krüger; F. de Castilhos; L. C. Filho; V. Cabral; J. Ninow y M. L. Corazza (2011). *Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil*. Biochemical Engineering Journal. 56(3):107-115.

## 7. CONCLUSIONES Y TRABAJOS A FUTURO

---



En la presente tesis se estudió la interesterificación enzimática entre aceite de soja y su correspondiente hidrogenado con el propósito de obtener productos grasos con propiedades físicas y funcionales mejoradas. Con el objetivo de realizar el seguimiento del desarrollo de la reacción se desarrolló e implementó una técnica analítica mediante la cual cuantificar los productos y subproductos de la reacción.

Se comenzó realizando un estudio de las variables de reacción mediante la metodología de diseño de experimentos. Se eligió un diseño factorial fraccionario para determinar la relación entre dichas variables y ciertas propiedades y características de los productos finales, ya sean físicas o composicionales. La significancia estadística de ciertas interacciones presentadas por los modelos de efectos demostraron la ventaja de aplicar este tipo de metodología frente al estudio clásico que consiste en variar de a una condición a la vez, manteniendo las restantes constantes.

En cuanto a las condiciones de reacción que resultaron ser más significativas cuando se plantea como objetivo la obtención de productos con mínima generación de productos secundarios y puntos de fusión similares a los presentados por los comerciales, éstos fueron: concentración y tipo de enzima, tiempo, relación de sustratos y contenido de agua del sistema. Las variables que no resultaron poseer ningún tipo de efecto significativo sobre las respuestas estudiadas en el dominio experimental definido por el diseño fueron temperatura y nivel de agitación.

Se llevó a cabo una optimización de las condiciones de reacción con el objetivo de definir la combinación de las mismas mediante la cual se lograra obtener productos con puntos de fusión semejantes a los de los productos comerciales y una mínima generación de subproductos de reacción.

El último objetivo planteado durante el desarrollo del Capítulo 3 consistió en el modelado de la relación entre los diferentes componentes mayoritarios de los productos y el punto de fusión de los mismos. Se encontró que el contenido de triglicéridos trisaturados y su interacción con la concentración de los mono y diglicéridos resultaron ser las variables con mayor significancia estadística.

Los resultados del Capítulo 3 permitieron realizar ciertas consideraciones respecto a las condiciones de reacción en las cuales se analizó la cinética de la reacción, análisis desarrollado en el Capítulo 4. Se consideró asimismo realizar estudios en presencia de hexano, factor no explorado en el capítulo anterior.

Mediante el estudio de la evolución en el tiempo de las diferentes especies involucradas en la reacción fue posible determinar fundamentalmente la manera en que las lipasas redistribuyen los residuos acilo sobre los diferentes glicéridos, incluyendo también el seguimiento de los productos secundarios de la reacción.

La interesterificación enzimática generó cambios de diferente magnitud en los distintos grupos de triglicéridos (definidos por el grado de insaturación de los residuos acilo esterificados a los mismos), los cuales fueron monitoreados de manera independiente. Más aún, fue posible realizar un análisis por especie de dichos glicéridos realizando un seguimiento de aquellos que resultaron mayoritarios en las mezclas reactivas iniciales y de los que se generaron en mayor medida como consecuencia del reacomodamiento llevado a cabo por parte de la enzima.

Se realizó una comparación del efecto de un cambio en la concentración de biocatalizador en el medio de reacción sobre los perfiles de productos y subproductos obtenidos, encontrándose importantes diferencias en la magnitud de los cambios generados por las lipasas. En cualquier condición los cambios relativos de los diferentes grupos de triglicéridos se mantuvieron invariantes, es decir que se conservaron las tendencias respecto al aumento o disminución de los mismos con el tiempo. El aumento en la concentración de biocatalizador generó cambios en los perfiles obtenidos para ambas lipasas, aunque éstos resultaron diferir entre sí, encontrándose diferencias no sólo a tiempos iniciales, sino también en los estados de equilibrio alcanzados por los sistemas.

Se evaluó el efecto de la relación de sustratos sobre la distribución relativa de los mencionados grupos, encontrándose diferencias evidentes en la misma según se presentara una mayor o menor proporción de aceite de soja a aceite de soja totalmente hidrogenado en la mezcla.

El análisis de la incorporación de hexano al medio de reacción exigió llevar a cabo las experiencias a menor temperatura, lo cual puede resultar una ventaja en cualquier sistema de reacción debido a la menor degradación sufrida por los compuestos presentes en el mismo, entre otros. Sin embargo, en la comparación de dichos sistemas con los correspondientes libres de hexano fue posible evaluar únicamente el efecto conjunto de ambos factores. Los perfiles de las distintas especies presentes se modificaron sustancialmente indicando velocidades relativas de hidrólisis y esterificación diferentes. Por otro lado, se encontraron cambios en los perfiles de concentración de los compuestos al cambiar la masa de biocatalizador presente en el medio. El efecto de un cambio de temperatura en los sistemas en cuestión fue también evaluada, encontrándose importantes diferencias en los perfiles cinéticos.

Por último, se llevó a cabo una comparación respecto a la acción de ambas lipasas comerciales. Se encontró que las velocidades iniciales de reacción resultaron diferir sustancialmente, indicando diferencias en las constantes cinéticas propias de cada una.

A partir del análisis llevado a cabo en el Capítulo 4 se planteó el desarrollo del siguiente capítulo. En el mismo se analizó en mayor detalle la distribución de los diferentes ácidos grasos (discriminados por grado de insaturación de sus cadenas carbonadas) sobre la molécula de glicerol. En particular se realizaron predicciones teóricas de los perfiles esperables según leyes de probabilidad considerando dos patrones diferentes de redistribución de residuos acilo, ya sea ésta totalmente al azar o manteniendo invariante el perfil ácido en posición *sn*-2. La comparación de dichas predicciones con los valores experimentales obtenidos luego del proceso de interesterificación enzimática reflejó una modificación sustancial del patrón de ácidos grasos en posición *sn*-2. Este resultado evidenció la presencia de una reacción química actuando en paralelo al mecanismo enzimático, responsable de dicha modificación.

En función de los resultados obtenidos mediante el estudio de la posición *sn*-2 se realizó un análisis detallado de la distribución de los diglicéridos entre los isómeros 1(3),2-diglicérido y 1,3-diglicérido con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes condiciones de reacción sobre la ocurrencia del mencionado fenómeno químico. Se

encontraron diferencias respecto a la acción de ambos biocatalizadores, adjudicándose las mismas al soporte de inmovilización utilizado en cada uno de los dos casos. De la misma manera, se evaluaron factores tales como la concentración de enzima en el medio de reacción, la relación de sustratos, el agregado de hexano y la temperatura en estos últimos sistemas, arribándose a resultados concluyentes en todos los casos.

El análisis experimental del comportamiento de cualquier sistema enzimático resulta más provechoso si los resultados pueden representarse a través de algún modelo matemático que caracterice el mecanismo de reacción involucrado. Con este fin, en el Capítulo 6 se desarrollaron diferentes modelos teóricos con el objetivo de representar la variación de las concentraciones de las especies intervinientes en la reacción. Se plantearon dos mecanismos de acción de las lipasas, difiriendo éstos respecto al modo de complejación de las enzimas con las distintas especies. Por otro lado, la derivación de los modelos se realizó planteando dos hipótesis comúnmente utilizadas en el área de cinética enzimática. Los modelos resultantes involucraron al menos 8 parámetros cinéticos y de equilibrio en los casos más simples, mientras que en los casos más complejos este número superó los 30, haciendo impracticable su aplicación al ajuste de conjuntos de datos experimentales de tamaños razonables.

En consecuencia, el ajuste de los datos se realizó haciendo uso de los modelos más simples obtenidos, resultando éstos incapaces de representar satisfactoriamente el comportamiento cinético del sistema en estudio. Las discrepancias encontradas entre los perfiles experimentales y los ajustados por los modelos podrían deberse a la previamente comprobada ocurrencia del fenómeno de acil migración, mecanismo no contemplado en la derivación de los modelos utilizados, cuyo origen mecanístico es puramente enzimático.

En función de los resultados obtenidos y limitaciones encontradas en el desarrollo de la presente tesis, a continuación se sugieren posibles trabajos a futuro a desarrollar.

En cuanto a las técnicas analíticas se propone mejorar la separación de ciertos picos cromatográficos de manera de reducir la superposición de los mismos y lograr una cuantificación más precisa de las diferentes especies de ácidos grasos y glicéridos

parciales. En caso de ser posible esta mejora, podría evitarse el planteo de ciertas suposiciones realizadas para el estudio de acil migración llevado a cabo y ahondarse en el análisis de la especificidad de sustrato por parte de las lipasas, entre otros.

Con respecto al estudio de la cinética de la reacción en sistemas con hexano, resultaría interesante evaluar los efectos de la presencia del mismo y de la temperatura de manera independiente.

Por último, y como consecuencia directa de los resultados obtenidos en el Capítulo 6 respecto a la incapacidad de los modelos cinéticos desarrollados de ajustar los datos experimentales obtenidos, se propone ahondar en los posibles fenómenos no considerados en dichos mecanismos, los cuales podrían explicar dichas desviaciones.

# ANEXO

---

## Lipozyme<sup>®</sup> RM IM

**Valid From** 2007-07-11

**Product Characteristics:**

Declared Enzyme	Lipase
Declared Activity	150 IUN/g
Colour	Brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Immobilized Granulate
Production organism	Aspergillus oryzae
Donor organism	Rhizomucor miehei
Production Method	Produced by submerged fermentation of a genetically modified micro organism. The enzyme protein, which in itself is not genetically modified, is separated and purified from the production organism.

**Product Specification:**

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Interestification Units IUN	150		/g
Loss on Drying	-	5	%
Total Viable Count	-	50000	/g
Coliform Bacteria	-	30	/g
Enteropathogenic E.Coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

**Packaging:** See the standard packaging list for more information.

## Recommended Storage:

Best before	When stored as recommended, the product is best used within 3 months from date of delivery.
Storage at customer's warehouse	0-10°C (32°F-50°F)
Storage Conditions	In unbroken packaging - dry and protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. Extended storage or adverse conditions such as higher temperature or higher humidity may lead to a higher dosage requirement.

## Safety and Handling Precautions

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. Powdered enzymes are readily inhaled and should be handled only with specific precautions to prevent inhalation of dust. All equipment and handling procedures must be designed to control airborne dust. Personal respiratory protection is recommended in all cases where full dust control is not secured. All spills, however minor, should be removed immediately. Use respiratory protection. Major spills should be carefully shovelled into plastic-lined containers. Minor spills and the remains of major spills should be removed by vacuum cleaning or flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes. A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.



## Lipozyme® TL IM

**Valid From**

**2007-11-06**

**Product Characteristics:**

Declared Enzyme	Lipase
Declared Activity	250 IUN/g
Colour	Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Immobilized Granulate
Production organism	Aspergillus oryzae
Donor organism	Thermomyces lanuginosus
Production Method	Produced by submerged fermentation of a genetically modified micro organism. The enzyme protein, which in itself is not genetically modified, is separated and purified from the production organism.

**Product Specification:**

	<b>Lower Limit</b>	<b>Upper Limit</b>	<b>Unit</b>
Interestification Units IUN	250		/g
Loss on Drying 105 C	-	8	%
Laser Diffraction >1030 micron	-	15	%
Laser Diffraction < 250 micron	-	10	%
Total Viable Count	-	50000	/g
Coliform Bacteria	-	30	/g
Enteropathogenic E.Coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

<b>Packaging:</b>	See the standard packaging list for more information.
<b>Recommended Storage:</b>	
Best before	When stored as recommended, the product is best used within 3 months from date of delivery.
Storage at customer's warehouse	0-10°C (32°F-50°F)
Storage Conditions	In unbroken packaging - dry and protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. Extended storage or adverse conditions such as higher temperature or higher humidity may lead to a higher dosage requirement.

### Safety and Handling Precautions

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. Powdered enzymes are readily inhaled and should be handled only with specific precautions to prevent inhalation of dust. All equipment and handling procedures must be designed to control airborne dust. Personal respiratory protection is recommended in all cases where full dust control is not secured. All spills, however minor, should be removed immediately. Use respiratory protection. Major spills should be carefully shovelled into plastic-lined containers. Minor spills and the remains of major spills should be removed by vacuum cleaning or flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes. A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.