

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Producción de Espermaceti Biotecnológico mediante Procesos Enzimáticos en Sistemas "Solvent-Free"

> Dña. Mar Serrano Arnaldos 2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

D^a. María Fuensanta Máximo Martín, Profesor Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Producción de espermaceti biotecnólogico mediante procesos enzimáticos en sistemas "solvent free"", realizada por D^a. Mar Serrano Arnaldos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de septiembre de 2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

D^a. María Claudia Montiel Morte, Profesor Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Producción de espermaceti biotecnólogico mediante procesos enzimáticos en sistemas "solvent free"", realizada por D^a. Mar Serrano Arnaldos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de septiembre de 2017

Trabajo presentado para optar al

Grado de Doctora por la Universidad de Murcia,

Mención Doctorado Internacional.

En Murcia, a 22 de Septiembre de 2017.

t

Mar Serrano Arnaldos, Ingeniera Química.



LE HAVRE, September 8th, 2017



To whom it may concern

EA 3221 CNRS FR 3038

Dr. Céline PICARD

+33232744394

celine.picard@univ-lehavre.fr

I, the undersigned Céline PICARD, assistant-professor of Colloids chemistry and physicochemistry at URCOM laboratory, in the Department of Chemistry at Le Havre Normandy University, attest that Mar SERRANO ARNALDOS has worked under my supervision from March 16th to June 15th 2015. Her stay has been financially supported by a fellowship associated with the project "Emulsifiers biosynthesis with food and cosmetic applications in solvent-free systems using commercial lipases" (CTQ2011-24091), which was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Commission (FEDER/ERDF).

The work carried out by Mar Serrano Arnaldos was part of her PhD thesis dealing with the enzymatic synthesis of emollient esters for cosmetic applications. During her stay at URCOM–Le HAVRE Normandy University, Mar Serrano Arnaldos has specifically investigated:

- Formulation of Oil-In-Water emulsions containing enzymatic esters synthesized by her (Cetyl Laurate, Myristate, palmitate, stearate and spermaceti) and also commercial esters.
- Microstructure characterization of emulsions via microscopy and static light scattering
- Mechanical and rheological characterization of emulsions via texture analyses and rotational rheology
- Thermal analyses of esters and emulsions via Differential Scanning Calorimetry.
- Chemical analyses of esters (enzymatic and commercial) via Chromatography.
- Data analyses and redaction of a scientific article.

It has been a pleasure to host Ms. Mar SERRANO ARNALDOS at URCOM – LE HAVRE NORMANDY UNIVERSITY. She has proved to have a vivid interest in her research, is eager to learn, so that she rapidly tackled new subjects and methodologies and fulfilled perfectly the numerous tasks to reach the goals of our collaboration.

Université du Havre URCOM Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire (EA-3221) 25 rue Philippe Lebon

tél +33 (0)2 32 74 43 96 BP 1123 76063 Le Havre CEDEX

www.univ-lehavre.fr

LE HAVRE, September 8th, 2017





To whom it may concern

EA 3221 CNRS FR 3038

Dr. Céline PICARD

+33232744394

Yours sincerely

celine.picard@univ-lehavre.fr

I have reviewed the thesis entitled "Spermaceti production by enzymatic processes in solvent-free systems", submitted by Ms. Mar Serrano Arnaldos for a PhD degree.

The aim of this Doctoral Thesis is the comparative study of the solvent-free synthesis of spermaceti by using immobilized lipases. For that purpose, she evaluates the efficiency of several commercial biocatalysts and a number of solid carriers, ranging from an epoxy resin to hydrophobic supports. The performance of the biocatalysts is also compared from an economic point of view and the reaction products are analyzed as ingredients of an O/W cosmetic emulsion.

I have concluded that this work deserves the award of the International Doctorate Mention due to the following reasons: The extension of the research work has been sufficiently wide and involves different experimental techniques in the immobilization of enzymes and the analysis of the cosmetic emulsions.

Experiments were well planned, properly described and cover the main objectives established in this Doctoral Thesis. Data analysis has been carried out with a robust scientific basis and the conclusions withdrawn are logical and well-founded. An extensive literature review has been performed and the bibliography is actual and pertinent.

The results and conclusions of the thesis have been clearly exposed and are comprehensible to professionals in the field.

Results are susceptible to be published in international peer-review journals focused both in the biotechnology or the cosmetic field.

Therefore I believe that Ms. Mar Serrano Arnaldos deserves the highest exposure to the international scientific scenario and this Doctoral Thesis is suitable for the International Doctorate Mention.

Université du Havre URCOM

Unité de Recherche en Chimie CrBuy 400 et Macromoléculair Céline PICARD (EA 3221)

tél +33 (0)2 32 74 43 96 25 rue Philippe Lebon BP 1123 76063 Le Havre CEDEX

www.univ-lehavre.fr



UNIVERSITĂ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche

Trieste, 16 September, 2017

To whom it might concern.

I have reviewed the thesis entitled **"Spermaceti production by enzymatic processes in solvent-free systems",** submitted by **Ms. Mar Serrano Arnaldos** for a PhD degree. The main objective of the doctoral dissertation proposed is the evaluation of the efficiency of several formulations of *Candida antarctica* lipase B prepared by immobilization onto polymeric matrices. The biocatalysts were tested in the synthesis of mixture of esters similar to the natural spermaceti. The formulations were compared with several commercial immobilized lipases. For that purpose, the optimal reaction conditions (amount of enzyme, temperature of the process, stirring speed) were identified and relevant parameters, such as the operational and storage stability of the biocatalysts, were evaluated. The kinetic study of the esterification process completed this study. An exhaustive analysis of the physicochemical characteristics of the product and its evaluation as a cosmetic ingredient were also performed. Finally, the work was completed by an economic analysis of the synthesis at laboratory scale.

Therefore, I have concluded that thesis of Ms. Mar Serrano Arnaldos is suitable for the award of the International doctorate mention.

A brief summary of my main reasons is reported here below:

- ✓ The thesis provides original ideas and some of the results obtained can be published in international peer-review journals and presented in national and international conferences.
- ✓ The extension of the research work has been sufficiently wide involving an important diversity of concepts, experimental techniques and data analysis.
- ✓ The information retrieval is based on extensive literature and studies and it is systematic, critical and relevant.
- ✓ The methods and techniques used have been properly described. They suit the purposes very well, and the data has been analysed skilfully and logically.
- ✓ The results and conclusions of the thesis have been clearly and logically presented. The discussion and conclusions obtained are critical, deep and well-founded. They demonstrate independent thinking and are clearly connected to the objectives previously established.
- ✓ Language and readability of the report are comprehensible to professionals in the field.

In conclusion, I firmly reiterate that this thesis meets the established criteria for an International doctorate mention.

In faith,

Prof. Lucia Gardossi Head of the Laboratory of Applied and Computational Biocatalysis Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche Universita' degli Studi di Trieste Piazzale Europa 1, 34127 Trieste – Italy Tel.: +39 040 558-3110/3103 e-mail: gardossi@units.it

Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche sedi: - via Licio Giorgieri,1 (amministrazione)

dipdscf@units.it tel +39 040 558 3902



www.dscf.units.it fax +39 040 558 3903

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN a través de los Proyectos de Investigación con referencia CTQ2011-24091 y CTQ2015-66723R, así como por la Comisión Europea (FEDER/ERDF).

Durante la ejecución del presente trabajo, su autora, Mar Serrano Arnaldos, ha disfrutado de una Beca-Contrato Predoctoral de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad con referencia BES-2012-060261.

Por ello, deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a dichas instituciones.

"Tu destino está en los demás tu futuro es tu propia vida tu dignidad es la de todos.

Otros esperan que resístas que les ayude tu alegría tu canción entre sus canciones.

Entonces síempre acuérdate de lo que un día yo escribí pensando en ti como ahora pienso.

Nunca te entregues ní te apartes junto al camíno, nunca dígas no puedo más y aquí me quedo.

La vida es bella, tú verás como a pesar de los pesares tendrás amor, tendrás amigos.

Por lo demás no hay elección y este mundo tal como es será todo tu patrimonio."

De *Palabras para Julia*, por José Agustín Goytisolo.

Hace exactamente 25 años, un joven estudiante de doctorado comenzaba la defensa de su Tesis afirmando que ésta suponía la cristalización de sus inquietudes científicas y humanísticas. Ciertamente, el ahora, y aún joven, Doctor estaba en lo cierto, puesto que mirando atrás me doy cuenta de cuánto me ha enriquecido, como profesional y como ser humano, el reto de hacer una Tesis Doctoral. Por el camino, he encontrado a mucha gente que, en mayor o menor medida, ha contribuido a que yo esté escribiendo estas palabras en este momento, y por ello me gustaría darles las gracias.

En primer lugar, quisiera agradecer al Grupo de Investigación "Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana", y concretamente al Dr. D. Antonio Bódalo Santoyo y al Dr. D. José Luis Gómez Carrasco, anterior y actual Investigador Principal del grupo, el haber depositado su confianza en mí y haberme brindado la oportunidad de participar en este proyecto. Desearía, además, añadir un agradecimiento especial al Dr. D. José Luis Gómez Carrasco por su contribución al desarrollo del modelo cinético de la síntesis.

*M*i más profundo agradecimiento a mis tutoras, la Dra. Dña. M^a Fuensanta Máximo Martín y la Dra. Dña. M^a Claudia Montiel Morte, por su inestimable ayuda a llevar este trabajo a buen puerto. Muchas gracias por todo el esfuerzo que supone dirigir una Tesis Doctoral como ésta, por ese "saber hacer" experimental y teórico, por todas las dudas resueltas y las recomendaciones, por la disponibilidad y la paciencia aun cuando otras labores apremiaban, y, sobre todo, por ese trato familiar y cariñoso que hace que una pequeña consulta de cinco minutos se convierta en un ameno rato de charla.

Quisiera extender estas palabras a la que, sin lugar a dudas, ha sido mi tercera tutora, la Dra. Dña. Josefa Bastida Rodríguez. A ella le agradezco el haber estado siempre al día sobre los tediosos papeleos de la Tesis, su capacidad para darle "el toque" que le falta a un artículo, su sinceridad y su cercanía.

*M*i agradecimiento asimismo a la Dra. Dña. Salvadora Ortega Requena, por su ayuda a la hora de comenzar la experimentación de este trabajo, por compartir su experiencia y más de un café conmigo.

A la Dra. Dña. Asunción M^a Hidalgo Montesinos le agradezco afectuosamente los buenos deseos, ánimos y sonrisas que me ha dedicado desde que realicé con ella mi Trabajo Fin de Carrera. Asimismo, me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. Dña. Elisa Gómez Gómez y a D. Daniel Delgado Torrico por su amabilidad e interés por mi trabajo. Desearía agradecer a la Dra. Dña. María Gómez Gómez y a la Dra. Dña. M^a Dolores Murcia Almagro su ayuda paciente con el cromatógrafo siempre que lo he necesitado. A ellas, y al resto de compañeras de café, les agradezco con cariño esos descansos a media mañana que hacen mucho más llevadero el trabajo diario.

Gracias también al resto de miembros del Departamento de Ingeniería Química, por acogerme con los brazos abiertos y ofrecerme la posibilidad de iniciarme en la labor docente.

Una mención especial de agradecimiento a D. Ramiro Martínez, de Novozymes, por todos los biocatalizadores que generosamente nos ha facilitado y sin los que no podría haber desarrollado este trabajo.

Al Dr. D. Patrick Adlercreutz, de la Universidad de Lund, le agradezco ampliamente el haberme dado la oportunidad de que mi primera estancia en el extranjero haya sido en una de las mejores universidades de Europa, así como la de colaborar con un investigador de su talla. Un cálido agradecimiento también a todos los compañeros del departamento y, especialmente, a mis compañeros de despacho, a los amigos del "café multilingua" por esas conversaciones desternillantes, y a mi familia del Möllevångsvägen 6E, por hacer de la preciosa Suecia un sitio un poco menos frío.

A la Dra. Dña. Céline Picard y a la Dra. Dña. Géraldine Savary, de la Universidad de El Havre, quisiera agradecerles profundamente el tiempo dedicado a introducirme en la formulación y el análisis cosmético, el haber puesto a mi disposición todos los equipos del URCOM, y su ayuda y correcciones en el análisis de los datos recogidos, que a día de hoy constituyen una parte fundamental de mi Tesis. Quisiera aprovechar para dar las gracias a todos los doctorandos del departamento por tratarme como una más de ellos. Un guiño especial a Audrey, por su amabilidad constante, y sobre todo, a Daria, por esos momentos sentadas en la puerta del laboratorio en los que compartíamos vivencias y consejos.

A la Dra. Dña. Lucia Gardossi, de la Universidad de Trieste, quisiera ofrecerle mi más sincero agradecimiento por el interés mostrado por mi trabajo desde el primer día que contacté con ella, por la estimulante discusión científica que compartimos y por su pasión contagiosa por la biocatálisis. Mil gracias a Simone por ser un gran compañero dentro del laboratorio, pero aún mejor fuera. A mi "goddess of the unicorns", Alice, siempre le agradeceré el abrirme las puertas de su casa, su apoyo y su amistad, que espero sigamos manteniendo a pesar de la distancia. Gracias también a Manuel, porque si me enamoré de Trieste, es porque pude verla a través de sus ojos. Estos años de doctorado me han dado la oportunidad de conocer a muchas personas que me han ayudado en este trabajo, pero si hay alguien a quien de verdad puedo agradecerle haber conseguido llegar hasta aquí es a ti, mamá. Creo que no existen palabras suficientes para darte las gracias por todo tu amor y todo lo que has hecho por mí y por mi hermana. Nos regalaste la mejor infancia del mundo y, en los peores momentos, mantuviste el pequeño barco que es nuestra familia a flote. Ahora que me hago "mayor" empiezo a darme cuenta del trabajo tan duro, abnegado y valiente que has hecho por nosotras. Gracias por ayudarme a convertirme en la persona que soy a día de hoy, mis logros son los tuyos. A Clara, "mi hermana y compañera de vida", gracias por todos esos momentos de mimos, travesuras, riñas y reconciliaciones que hemos pasado juntas y que guardo en mi corazón bajo llave. Siempre me tendrás ahí cuando me necesites realmente, para lo bueno y, ante todo, para lo malo. Os quiero infinito.

Con especial cariño, quisiera darle las gracias al resto de mi familia. A mis abuelos, porque cada instante que pasé con ellos es un tesoro y no hay día en que no estén presentes en mi pensamiento. A mis tíos, por su apoyo inquebrantable y por esas mañanas de "arriesgar la vida" enseñándonos a conducir. A mis primos, por hacer de las comidas familiares una de las mejores partes de la semana. A mi chacha Maruja, por esas noches de eterna conversación en torno a su mesa, y a mi chache Antonio, porque sé que le hubiera hecho especial ilusión este momento. Y por supuesto, gracias a mi Bibi por ser tal y como es.

Me gustaría también agradecerle todo el amor y la alegría que me ha dado a mi valenciana favorita, Elena. Porque a pesar del tiempo y los kilómetros, cuando nos reencontramos es como si te hubiese visto el día anterior. Más que una amiga, te considero familia.

A Nuria, mi mejor confidente y leal consejera, gracias por todo tu cariño y sinceridad, y por esos gabinetes de crisis que hemos montado a deshora cada vez que teníamos un problema y que tanto me han ayudado.

Quisiera darle las gracias también a mi amiga Ariana. Apenas sabíamos hablar cuando nos conocimos y nos hemos hecho mujeres juntas; espero que también viejitas. A mis compis del cole, especialmente a Manu y a Adri, les agradezco todos esos recuerdos de infancia y adolescencia que tantas risas nos despiertan ahora. A mis colegas de Mazarrón, gracias por esas barbacoas en la playa a la luz de la luna, por esas excursiones de senderismo en las que no sé cómo no nos hemos despeñado o, simplemente, por todas esas veces que hemos arreglado el mundo delante de una cerveza. Deberíamos repetirlas más a menudo.

A mi amigo Fer, o más bien "mi querido Ferdinand", un millón de gracias por esos consultorios amorosos delante de una taza de té, por todas las veces que hemos salido a explorar nuevos sitios y por estar siempre dispuesto a echar una mano. En muy poco tiempo has sabido convertirte en uno de mis amigos más preciados, y por ello te doy las gracias.

Cómo no, a los mikes Edu, Manolo, Yeclan, y muy especialmente ("con cariño máximo") a Javi N., os agradezco mucho todas las noches locas por Murcia a ritmo de buena música, bailoteos y risas, en las que me habéis hecho sentir una más de vosotros y me habéis cuidado tanto.

Me gustaría dedicarte mi último agradecimiento a ti, Patri. Llegaste a la vez que comenzaba mi doctorado y desde entonces has sido una fuente de apoyo y fuerza inagotable. Gracias por todas las tardes que has pasado ayudándome a mejorar las imágenes de mi Tesis o escuchando con paciencia y atención todos los ensayos de mis exposiciones. Gracias por intentar animarme cuando tenía un mal día en el laboratorio y por ayudarme a trasladarme en mis estancias y aguantar tantos meses separados. Pero sobre todo, quisiera darte a las gracias por nuestro amor, que con sus pequeñas imperfecciones es perfecto para mí y me llena de paz y esperanza. Tú eres mi otro hogar, te quiero.

A mi madre, por su amor sin límites.





Índice

1. Introducción y objetivos1
2. Antecedentes
2.1. El blanco de ballena9
2.1.1. Origen del espermaceti natural9
2.1.2. Obtención tradicional del espermaceti 11
2.1.2.1. La caza de cachalote
2.1.2.2. Producción del espermaceti de origen animal14
2.1.3. Características y composición del blanco de ballena
2.1.4. Aplicaciones del espermaceti y sus derivados
2.1.5. Alternativa natural al blanco de ballena
2.2. El sector cosmético y la formulación de productos20
2.2.1. Situación actual del mercado de la cosmética
2.2.2. Legislación en cosmética
2.2.2.1. Marco jurídico de los productos cosméticos
2.2.2.2. Regulación de la cosmética natural
2.2.3. Formulación cosmética y rol de los emolientes

2.3. Biocatálisis industrial
2.3.1. Ventajas de los procesos enzimáticos aplicados a la industria
2.3.2. Las lipasas: estructura y características
2.3.3. Uso industrial de las lipasas
2.3.3.1. Eliminación de grasas y aceites
2.3.3.2. Producción de biocombustibles45
2.3.3.3 Síntesis de polímeros
2.3.3.4. Gestión de residuos y tratamiento de efluentes industriales
2.3.3.5. Industria alimentaria
2.3.3.6. Elaboración de productos farmacéuticos intermedios
2.3.3.7. Obtención de ingredientes cosméticos
3. Materiales y métodos
3.1. Materiales
3.1. Materiales
3.1. Materiales
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.3. Soportes para la inmovilización 57
3.1. Materiales53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores533.1.1.1. Sustratos533.1.1.2. Biocatalizadores533.1.1.3. Soportes para la inmovilización573.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa57
3.1. Materiales533.1.1. Reactivos y biocatalizadores533.1.1.1. Sustratos533.1.1.2. Biocatalizadores533.1.1.3. Soportes para la inmovilización573.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa573.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas57
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.3. Soportes para la inmovilización 57 3.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa 57 3.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas 57 3.1.1.6. Reactivos para el seguimiento de la esterificación y la caracterización química del producto de reacción 58
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.3. Soportes para la inmovilización 57 3.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa 57 3.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas 57 3.1.1.6. Reactivos para el seguimiento de la esterificación y la caracterización química del producto de reacción 58 3.1.1.7. Ingredientes para la formulación de una crema cosmética estándar 59
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.3. Soportes para la inmovilización 57 3.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa 57 3.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas 57 3.1.1.6. Reactivos para el seguimiento de la esterificación y la caracterización química del producto de reacción 58 3.1.1.7. Ingredientes para la formulación de una crema cosmética estándar 59 3.1.2. Equipos 59
3.1. Materiales 53 3.1.1. Reactivos y biocatalizadores 53 3.1.1.1. Sustratos 53 3.1.1.2. Biocatalizadores 53 3.1.1.3. Soportes para la inmovilización 57 3.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa 57 3.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas 57 3.1.1.6. Reactivos para el seguimiento de la esterificación y la caracterización química del producto de reacción 58 3.1.1.7. Ingredientes para la formulación de una crema cosmética estándar 59 3.1.2. Equipos 59 3.1.2.1. Sistema para la inmovilización de enzimas 59

3.1.2.3. Equipo para la experimentación a presión reducida
3.1.2.4. Equipos para la formulación de cremas cosméticas
3.1.2.5. Otros equipos
3.2. Métodos 69
3.2.1. Protocolos para la inmovilización de enzimas
3.2.1.1. Inmovilización por adsorción
3.2.1.2. Inmovilización por enlace covalente
3.2.2. Método de Lowry para el análisis de proteínas70
3.2.3. Síntesis de los ésteres cetílicos71
3.2.3.1. Experimentos a presión atmosférica71
3.2.3.2. Ensayos a presión reducida72
3.2.4. Métodos analíticos para la caracterización del producto de reacción75
3.2.4.1. Número ácido
3.2.4.2. Valor de hidroxilo
3.2.4.3. Valor de saponificación
3.2.4.4. Índice de yodo
3.2.4.5. Determinación del contenido en agua por el método Karl Fischer
3.2.4.6. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución
3.2.5. Formulación de una emulsión cosmética estándar80
3.2.6. Análisis de las propiedades de una emulsión cosmética
3.2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido
3.2.6.2. Análisis de textura
3.2.6.3. Granulometría por difracción láser
3.2.6.4. Microscopía óptica

Índice

4. Resultados y discusión
4.1. Obtención de espermaceti biotecnológico con derivados inmovilizados comerciales
4.1.1. Estudios previos en un reactor abierto
4.1.1.1. Comprobación de la actividad de los biocatalizadores comerciales
4.1.1.2. Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción
4.1.1.3. Influencia de la presencia de humedad en el medio de reacción90
4.1.2. Optimización del proceso de síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones
4.1.2.1. Influencia de la concentración de biocatalizador
4.1.2.2. Influencia de la temperatura de operación100
4.1.2.3. Estudio de la reutilización de los biocatalizadores
4.2. Inmovilización de Lipozyme [®] CALB L105
4.2.1. Selección del activador para la inmovilización por adsorción105
4.2.2. Estudio de los resultados de la inmovilización106
4.3. Obtención de espermaceti biotecnológico con derivados inmovilizados de Lipozyme [®] CALB L111
4.3.1. Estudios previos en un reactor abierto 111
4.3.1.1. Comprobación de la actividad de los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio
4.3.1.2. Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción 112
4.3.2. Optimización del proceso de síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones
4.3.2.1. Influencia de la concentración de biocatalizador 113
4.3.2.2. Influencia de la temperatura de operación
4.3.2.3. Estudio de la estabilidad al almacenamiento125

4.3.2.4. Estudio de la reutilización de los biocatalizadores
4.3.2.5. Influencia de la velocidad de agitación129
4.3.2.6. Comparación de la actividad de los derivados inmovilizados
4.4. Modelo cinético de la síntesis de espermaceti136
4.4.1. Hipótesis del modelo cinético
4.4.2. Aplicación del modelo cinético a la síntesis de los ésteres cetílicos por separado
4.4.2.1. Determinación de la constante cinética global del proceso
4.4.2.2. Relación entre la constante cinética global y la cantidad de biocatalizador presente en el reactor
4.4.3. Aplicación del modelo cinético a la síntesis del blanco de ballena156
4.4.3.1. Determinación de la constante cinética global del proceso: relación con la ecuación de Arrhenius
4.4.3.2. Determinación de la constante cinética global del proceso de síntesis de espermaceti mediante las constantes de los ésteres por separado
4.5. Comparativa general de la síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones
4.6. Evaluación del blanco de ballena y sus ésteres como ingredientes cosméticos
4.6.1. Caracterización fisicoquímica de los productos biotecnológicos166
4.6.1.1. Adecuación a las especificaciones comerciales
4.6.1.2. Análisis de las muestras por HPLC
4.6.2. Efecto de los productos enzimáticos en una emulsión cosmética
4.6.2. Efecto de los productos enzimáticos en una emulsión cosmética
 4.6.2. Efecto de los productos enzimáticos en una emulsión cosmética
 4.6.2. Efecto de los productos enzimáticos en una emulsión cosmética

4.6.2.5. Análisis de la microestructura de las cremas: microscopía óptica 185
4.7. Estudio económico del proceso de esterificación a escala de laboratorio187
4.7.1. Cálculo del coste de operación de los equipos
4.7.2. Coste de la síntesis de espermaceti empleando biocatalizadores comerciales 189
4.7.3. Coste de la síntesis de espermaceti empleando derivados inmovilizados de Lipozyme [®] CALB L
4.7.3.1. Determinación del coste de la inmovilización
4.7.3.2. Determinación del coste de la obtención de espermaceti
5. Conclusiones
6. Bibliografía205
7. Anexos
8. Summary



1. Introducción y objetivos

1. Introducción y objetivos.

Desde el albor de la humanidad, comunidades a lo largo de todo el mundo han explotado los recursos, la fauna y la flora disponibles para garantizar su supervivencia y desarrollo. Concretamente, los productos obtenidos a partir de los mamíferos marinos, tales como el marfil, las barbas, el aceite, el cuero o el hueso han sido una fuente ancestral de riqueza para el ser humano, destacando entre ellos el espermaceti.

También denominado "blanco de ballena", el espermaceti es una mezcla de ésteres céreos extraída de la cavidad craneal del cachalote, compuesta mayoritariamente por laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo en distintas proporciones. Tradicionalmente, el espermaceti ha sido ampliamente utilizado en farmacia, cosmética y en la fabricación de velas de gran calidad.

No obstante, la sobreexplotación continuada de los grandes cetáceos durante varios siglos llevó a la prohibición de la caza del cachalote y otras especies de ballena en los años 80, de forma que la floreciente industria relacionada con este tipo de productos tuvo que encontrar alternativas sintéticas para continuar con su actividad. En el caso del espermaceti, se ha recurrido a la síntesis química de los ésteres que lo componen mediante procedimientos industriales que requieren elevadas temperaturas y catalizadores difíciles de gestionar tras su agotamiento. Además, la cantidad de reacciones secundarias producidas dan lugar a numerosos subproductos y hacen necesarias diversas etapas de post-tratamiento que mejoren la pureza y las características organolépticas del producto final para poder ser utilizado como ingrediente cosmético.

En contraposición, los procesos de síntesis biocatalítica basados en el uso de lipasas permiten la obtención de ésteres grasos bajo condiciones de reacción moderadas, reduciendo tanto las reacciones indeseadas como la generación de residuos debido al alto grado de especificidad de dichas enzimas. Se ha descrito asimismo que las lipasas exhiben una excelente actividad cuando se hallan en interfases agua-lípido, lo que las hace muy atractivas para la obtención de ésteres emolientes como los del espermaceti en medios de reacción libres de disolventes. El uso de estos sistemas resulta además muy ventajoso, ya que evitan el uso de disolventes orgánicos tóxicos o prohibidos por la legislación en cosmética vigente.

Por lo tanto, resulta lógico que este tipo de procesos se haya hecho un hueco dentro de la industria cosmética, ya que este mercado se ve cada vez más condicionado por las exigencias de los consumidores en cuanto a la calidad del producto y el respeto por el medio ambiente. Además, actualmente, los ingredientes cosméticos obtenidos por vía enzimática pueden ser etiquetados como "naturales", lo que aumenta considerablemente el valor añadido de dichos productos.

A pesar de ser una alternativa prometedora a los sistemas productivos convencionales, el uso de enzimas como catalizadores de procesos químicos se encuentra circunscrito al campo de la química fina, debido a la elevada inversión económica que supone su adquisición. Por lo tanto, a día de hoy un gran número de trabajos científicos se centran en tratar de disminuir dicho coste a través de la reducción del propio coste de elaborar la preparación enzimática y/o de la mejora de la actividad y estabilidad del biocatalizador.

En este contexto se enmarca la investigación llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral, cuyo objetivo principal es la puesta a punto de un método para la obtención de espermaceti por vía biocatalítica, comparando para ello el rendimiento de distintos derivados inmovilizados de lipasa, tanto de origen comercial como propios.

Los estudios realizados en este trabajo siguen la línea de investigación iniciada por el Grupo de Investigación "Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana" de la Universidad de Murcia, gracias al proyecto financiado por el MICINN y la Comisión Europea (FEDER/ERDF) con el título "Biosíntesis de emulsionantes con aplicaciones alimentarias y cosméticas, en sistemas "solvent-free", utilizando lipasas comerciales", CTQ2011-24091. Dicho Grupo de Investigación posee una amplia experiencia en la síntesis de diversos productos empleando lipasas, tanto libres como inmovilizadas, y ha sintetizado con gran éxito polirricinoleato de poliglicerol, un aditivo alimentario, y varios ésteres emolientes como el miristato de miristilo o el ricinoleato de cetilo.

De este modo, con el fin de establecer un proceso biocatalítico para la obtención del espermaceti que sustituya al obtenido tradicionalmente del cachalote y que presente una mayor calidad que el sintetizado por métodos químicos, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

• La obtención de diversos derivados de lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizados sobre resinas poliméricas de distinta naturaleza, estudiando la influencia de las distintas características del soporte en el proceso de inmovilización.
- El estudio del proceso de obtención del espermaceti en una sola etapa, así como de sus ésteres por separado, en un medio "solvent-free", empleando para ello los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio y otros derivados inmovilizados comerciales. Durante este estudio, se evaluará y comparará la actividad y la estabilidad de los diferentes preparados enzimáticos bajo las condiciones de proceso.
- La optimización del proceso de síntesis a presión reducida y en atmósfera inerte, a través de la determinación de las mejores condiciones de temperatura y concentración de biocatalizador, así como de velocidad de agitación cuando sea necesario.
- El desarrollo de un modelo cinético simplificado que permita describir el proceso de síntesis del espermaceti y los ésteres que lo componen bajo las condiciones de operación estudiadas.
- La caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos con el fin de establecer si son comparables con el espermaceti y los ésteres cetílicos comercializados actualmente.
- La evaluación del efecto de los diferentes compuestos biotecnológicos como parte de una emulsión cosmética.
- La determinación del coste del proceso de síntesis optimizado del espermaceti a escala de laboratorio, tanto para los biocatalizadores comerciales como para los propios.



2. Antecedentes

2. Antecedentes.

2.1. El blanco de ballena.

2.1.1. Origen del espermaceti natural.

El blanco de ballena, o espermaceti, es una mezcla cérea de color blanco rica en ésteres de cadena larga producida por el cachalote (*Physeter macrocephalus* o *Physeter catodon* [1,2]). El cachalote es un mamífero marino gregario, cuyo hábitat se extiende por todas las aguas marinas profundas no heladas del planeta. Es por ello que excepto en las altas latitudes del Ártico, se le pueda encontrar tanto en océanos como en mares abiertos o parcialmente cerrados como el mar de Okhotsk, el golfo de México, el golfo de California o el Mediterráneo, donde es uno de los grandes cetáceos más comunes [3,4]. El cachalote es además el más grande de los odontocetos (cetáceos que poseen dientes en vez de barbas), y debido a su gran tamaño, su amplia distribución geográfica y el número estimado de ejemplares existentes, es considerado un actor clave en el equilibrio de los ecosistemas marinos [4].

Dentro del cachalote, el espermaceti se encuentra albergado mayoritariamente en el interior de su cabeza, concretamente en el órgano del espermaceti y en el melón (Figura 2.1). El órgano del espermaceti está compuesto por un tejido esponjoso y suave con forma de barril. Se encuentra cerrado arriba y lateralmente por una carcasa fibrosa extremadamente resistente, mientras que por su lado ventral está limitado por tejido conectivo en el extremo anterior y, posteriormente por el saco frontal. El melón se sitúa debajo del órgano del espermaceti y es más robusto que éste, ya que se encuentra dividido en segmentos por septos verticales de tejido conectivo que a su vez se encuentran unidos por los extremos. A la temperatura corporal del cachalote, el espermaceti fluye con facilidad, saturando ambos elementos [5,6].

Dentro de estos órganos se encuentra también el aceite de cachalote, una sustancia rica en triglicéridos que además contiene ésteres de alto peso molecular semejantes a los del espermaceti [7].



Figura 2.1- Diagrama de la cabeza del cachalote [8].

Las funciones biológicas que se le ha atribuido al órgano del espermaceti y el melón a lo largo del tiempo son diversas. La primera de ellas fue la ideada por los propios marinos que daban caza a las ballenas: dado que el espermaceti se encuentra dentro de la cabeza del cachalote en forma de líquido blanquecino, fue confundido con los fluidos que contienen los gametos masculinos del animal. Esta teoría no podría ser más errónea, puesto que, a pesar de su dimorfismo sexual, el blanco de ballena se encuentra tanto en la cabeza de los especímenes macho como en la de las hembras. Sin embargo, esta creencia llegó a estar tan consolidada que hasta dio lugar al nombre de este compuesto, ya que el término espermaceti deriva del griego *sperm(at)* ($\sigma\pi \epsilon \rho - \mu \alpha / - \mu \alpha \tau o \zeta$), "semilla" o "semen" y $k \bar{e}t(o)$ ($\kappa \eta \tau o \zeta$) literalmente "monstruo marino o ballena" [5,9].

Más allá de la novela de ficción Moby Dick, escrita por Herman Melville en 1851, no resulta difícil encontrar testimonios reales de marineros en los que se describen ataques de cachalotes a navíos. Una buena parte de ellos pertenecen al siglo XIX, durante el cual estos cetáceos fueron responsables del hundimiento de barcos balleneros de más de 200 toneladas cuando actuaban en defensa propia tras ser arponeados. Estos relatos apuntan que, entre otros fines, tanto el órgano del espermaceti como el melón podrían servir ocasionalmente como arma de ataque contra amenazas externas o contra otros machos cuando pelean entre ellos [10].

Por otra parte, una de las teorías más asentadas sobre la finalidad de estos órganos y de su contenido defiende que el espermaceti es un elemento clave para el control de la flotabilidad del cachalote. Así, al sumergirse el animal vacía sus pulmones y dilata sus capilares sanguíneos para favorecer el intercambio de calor con el melón, a la vez que introduce agua fría por su conducto nasal derecho para enfriar el órgano del espermaceti. De este modo, consigue enfriar el blanco de ballena contenido en su cabeza, elevando su densidad, lo que le permite equilibrar la fuerza de sustentación variable conforme se va sumergiendo hasta la profundidad deseada, en la que entra en estado de bradicardia y vasoconstricción. Llegado el momento de la ascensión, cesa la bradicardia y comienza la vasodilatación de los capilares, de forma que el espermaceti vuelve a fundir, disminuyendo su densidad, lo que facilita la ascensión del cetáceo a la superficie con un menor esfuerzo [11].

No obstante, estas hipótesis han sido recientemente discutidas, y en este momento la más aceptada por los expertos en la materia es la que propone que ambos órganos sirven como amplificadores de los breves impulsos sonoros, denominados clics, que los cachalotes generan con fines comunicativos y de ecolocalización. De este modo, el pulso generado en los labios fónicos y el saco distal, recorren en primer lugar el órgano del espermaceti, para llegar al saco frontal, donde es reflejado para que recorra el melón. Este proceso se repetirá una o varias veces antes de ser transmitidos por el agua, dependiendo de si el objetivo del clic es actuar como biosonar o como medio de comunicación, respectivamente [12–14].

2.1.2. Obtención tradicional del espermaceti.

2.1.2.1. La caza de cachalote.

Desde hace más de un milenio, las ballenas han sido perseguidas y cazadas no sólo como fuente de alimento, sino también por sus barbas, sus huesos o para extraer el aceite de sus tejidos adiposos. Sin embargo, aunque todos los cetáceos sintetizan mezclas más o menos complejas de lípidos [5], por su composición es el espermaceti de los cachalotes uno de los que más interés comercial ha suscitado a lo largo de la historia, ya que era ampliamente utilizado para producir velas de gran calidad, lubricantes industriales y principalmente, como excipiente en la industria farmacéutica y cosmética.

Se considera que la industria ballenera nació como tal en torno a 1550 en los países del norte y noroeste de Europa, mientras que la caza costera comenzó en Norteamérica a principios del siglo XVII. Esta incipiente industria conllevó la desaparición de las ballenas en las áreas de costa y la aparición de los primeros barcos balleneros para pesca de altura [15]. El interés por una u otra especie de ballena variaba según el número de individuos disponible y el atractivo comercial de los productos obtenidos a partir de dicha especie, por lo que en lo que respecta a la caza del cachalote, se pueden identificar dos grandes periodos en los que su persecución se produjo a gran escala. El primero, que se corresponde con el de la pesca ballenera "tradicional", comenzó en 1712, alcanzó su apogeo en torno a 1830 y continuó hasta principios del siglo XX, en el que los nuevos desarrollos tecnológicos dieron lugar a una nueva generación de barcos balleneros. Tan sólo en Norteamérica, se estima que 225000 ejemplares de cachalote fueron cazados de 1804 a 1876 y que, durante la época de mayor auge, los balleneros norteamericanos podían servir alrededor de 100000 barriles de aceite crudo de cachalote por año [4,16].

La gran disminución de los stocks de ballena, dio lugar en 1942 a la creación de la Comisión Ballenera Internacional (CBI), que tenía como principal objetivo regular la persecución de las especies más amenazadas. No obstante, la falta de conocimiento sobre el estado real de las poblaciones de cetáceos a lo largo del globo terráqueo llevó a que tras ser fundada, la CBI implantara cuotas de captura excesivas, de forma que no se logró evitar que el cachalote se convirtiera por segunda vez en un objetivo destacado alrededor de 1950, siendo su captura especialmente intensa durante los años 60 (Figura 2.2). A modo ilustrativo, se calcula que de 1951 a 1976, 220000 cachalotes fueron capturados por la URSS y Japón [4,17–19].



Figura 2.2- Histórico de la captura del cachalote entre 1800 y 1999 [4].

La desastrosa situación de las poblaciones de ballenas y la aparición de movimientos sociales en contra de su caza provocó el inicio del declive de la industria ballenera, de manera que para finales de la década de los 70, sólo Noruega, Japón, Islandia y la URSS continuaban favoreciendo este tipo de negocio [17].

En un nuevo esfuerzo por aumentar el número de ejemplares, la CBI aprobó una moratoria de la caza de ballenas en 1982 que se hizo efectiva entre los años 1986 y 1988. Además, todos los cetáceos fueron incluidos en el listado de especies protegidas por la Convención Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, que prohíbe el comercio internacional de cualquier parte o derivado de las especies en peligro de extinción enumeradas, según la gravedad de su situación, en los Apéndices I, II y III del texto surgido de dicha convención [4,17,19,20].

Estas medidas no fueron bien acogidas por los países con mayor tradición ballenera, que actualmente no han cesado de forma definitiva su actividad. De hecho, oponiéndose abiertamente a la moratoria, Islandia abandonó la CBI y Noruega se reservó su derecho a continuar con la caza de ballenas. Japón, por su parte, ha apresado casi 10000 ballenas desde 1987 para el desarrollo de diversos programas científicos, lo que supone 4.5 veces más que el número de ballenas capturadas para investigación por el resto de países de la CBI desde 1952.

Este elevado volumen de muertes hace pensar que la caza con fines científicos sería sólo un pretexto para intentar satisfacer la demanda interna japonesa de productos obtenidos a partir de estos animales [17,19,21,22].

No obstante, la CBI permite cazar ballenas a ciertas poblaciones aborígenes para su subsistencia y el mantenimiento de sus tradiciones (Figura 2.3), siendo la caza del cachalote especialmente relevante para comunidades de las Antillas e Indonesia [23].



Figura 2.3- Lugares en los que se admite la caza de ballena entre las poblaciones aborígenes. 1) Groenlandia occidental. 2) Antillas menores. 3) Alaska del norte (EEUU).
4) Chukotka (Rusia). 5) Guinea Ecuatorial. 6) Islas menores de la Sonda (Indonesia).
7) Filipinas. 8) Zona del Ártico oeste de Canadá. 9) Zona del Ártico este de Canadá.
10) Washington (EEUU). 11) Isla de Vancouver (Canadá). 12) Reino de Tonga [23].

Desafortunadamente, todavía no se ha conseguido hallar un método de estimación poblacional de ballenas eficaz a nivel mundial, por lo que a día de hoy no se conoce con exactitud cuántos cachalotes viven en nuestros océanos [4,21,24,25]. Sin embargo, existen estudios en zonas localizadas que demuestran que tras diez años del cese de la actividad ballenera, el número de cachalotes seguía disminuyendo, principalmente debido a la baja tasa de reposición causada por ausencia de machos en edad reproductiva, y que para 1999 la población de cachalotes podría suponer entorno a un 32% de la población existente antes de la aparición de la industria ballenera. [4,24]. Estudios más recientes (de 2005 a 2015) demuestran que por desgracia esta tendencia sigue vigente, por lo que además de la prohibición de la caza de ballenas, deberían tomarse medidas urgentes para reducir las perturbaciones antrópicas de su hábitat, que principalmente son [19,26–28]:

- La contaminación química de los océanos, puesto que se han detectado niveles alarmantes de metales pesados y contaminantes, como los productos fitosanitarios, durante las biopsias de cachalotes.
- La contaminación física de las aguas marinas, ya que el ahogo con plásticos y otros desechos, y especialmente su ingestión, son fatales para los mamíferos marinos.

- La contaminación sonora de su entorno, que puede provocar problemas, tanto crónicos como agudos, en la ecolocalización y comunicación de los cachalotes, de estrés y de modificación de su comportamiento.
- La pesca, ya que son relativamente frecuentes los atrapamientos en las redes de los pescadores.
- Las colisiones fortuitas con barcos, que pueden ser fuente de lesiones severas o mortales para los grandes cetáceos cuando se producen con embarcaciones de gran eslora (mayor de 80 m) o a altas velocidades (superiores a 14 nudos). Además, se ha observado que en zonas de mayor concentración de ejemplares y de alto trasiego de embarcaciones como, entre otros, las Islas Canarias o la zona este del Caribe, estos choques suponen una amenaza significativa para los cachalotes.

A la merma de las poblaciones provocada por la acción del hombre, hay que añadir las muertes por amenazas de origen natural, que son mayoritariamente las enfermedades y el ataque de las orcas, el único depredador del cachalote [28,29].

2.1.2.2. Producción del espermaceti de origen animal.

El proceso de producción del espermaceti comenzaba con el despiece minucioso de la cabeza del cachalote, tras lo cual la materia que compone el órgano del espermaceti era exprimida manualmente, extrayéndose un aceite que se hacía hervir junto o separado con el contenido del melón. De este modo, se obtenía un aceite bruto compuesto de la mezcla del espermaceti con el aceite de cachalote contenido en el tejido graso de la cabeza, acompañados de impurezas procedentes de ambos órganos. Este proceso se realizaba a veces dentro del propio barco ballenero para evitar la rancidez del producto. Ya en tierra, el aceite crudo era recalentado a más de 100 °C entre 6 y 10 horas, de forma que se eliminara la mayor parte de agua posible, tras lo cual era dejado enfriar y almacenado en torno a 0 °C de 10 a 14 días. Así, las distintas fracciones de grasas y ceras contenidas se separaban según iban solidificando y el producto era prensado a diferentes presiones y temperaturas dando lugar a cuatro fracciones distintas en las que el espermaceti crudo era la de mayor punto de fusión [16]. El blanco de ballena recuperado tras el prensado era fundido de nuevo en cubas o cisternas y sometido a un proceso de refino para eliminar restos de aceite de cachalote y un blanqueado con una disolución alcalina diluida, generalmente hidróxido de potasio o de sodio, añadiendo, si era preciso, una salmuera que evitara que también saponificase el espermaceti. Tras el refinado, el producto estaba listo para ser moldeado y comercializado [16,30,31].

Por otra parte, era posible encontrar en el mercado un espermaceti obtenido de la hidrogenación catalítica del aceite de cachalote, que era comercializado bajo la etiqueta de "sintético". Dicho producto presentaba una composición más rica en ésteres de alcoholes grasos con una cadena carbonada más larga que las del espermaceti natural, por lo que era ligeramente más duro y su punto de fusión era mayor [7,30,32].

2.1.3. Características y composición del blanco de ballena.

El espermaceti es un sólido cristalino de color blanco nacarado a temperatura ambiente (Figura 2.4). Su apariencia es la de una cera dura ligeramente grasa al tacto que se puede raspar con facilidad. Este compuesto es, además, insoluble en agua, pero soluble en éter etílico, cloroformo y hexano, así como en etanol y acetona en caliente [33].



Figura 2.4- Fotografía de una muestra de espermaceti [34].

Las características fisicoquímicas del blanco de ballena, que se muestran en la Tabla 2.1, están estrechamente relacionadas con su alto contenido en ésteres de ácidos y alcoholes grasos, y un relativamente bajo contenido en triglicéridos [5,30–32,35,36].

Productor	Desconocido [15]	JEEN International Corporation [37]	Imperial-Oel-Import [38]	
Origen	Posiblemente animal	emente animal Sintético		
Apariencia	Cérea	Copos blancos	Pellets céreos	
Color	Blanco cristalino	\leq 1 (escala Gardner)	Blanco	
Olor	A pescado	Suave		
Punto de fusión (°C)	41 - 49	43 - 47	46 - 49	
Número ácido (mg KOH/g muestra)		≤5.0	≤1.5	
Valor de saponificación (mg KOH/g muestra)	121 – 135	109 – 120	105 – 120	
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)	2.6 - 3.8	≤1.0	≤1.0	

 Tabla 2.1- Características fisicoquímicas de muestras de espermaceti comercial.

Dado su alto valor industrial, en la literatura científica se puede encontrar un amplio número de estudios sobre la composición química del espermaceti. Uno de los trabajos publicados a este respecto por Carlier et al., sugiere que está formado por cuatro fracciones diferenciadas de compuestos, cuya importancia relativa sería la siguiente: un 90% de ésteres, un 5% de triglicéridos, un 2% de alcoholes y ácidos grasos libres y un 0.1% de hidrocarburos (el porcentaje restante no pudo ser recuperado) [30]. No obstante, el blanco de ballena es una sustancia de origen animal, por lo que las proporciones de cada una de las sustancias que lo constituyen pueden variar según el sexo, edad y hábitat del cachalote [5]. Así pues, otros autores sugieren composiciones similares a las de este estudio, pero en las que varía el porcentaje de cada familia de compuestos, habiéndose llegado a observar una riqueza en ésteres de hasta el 95% del total del espermaceti [36].

De este modo, a pesar de que su composición es variable y heterogénea, la mayor parte de publicaciones coinciden en que, en una proporción u otra, el blanco de ballena está compuesto principalmente por miristato de cetilo ($C_{30}H_{60}O_2$) y palmitato de cetilo ($C_{32}H_{64}O_2$), acompañados en una menor proporción de laurato de cetilo ($C_{28}H_{56}O_2$) y estearato de cetilo ($C_{34}H_{68}O_2$). Como se ha mencionado previamente, estos cuatro ésteres junto con cantidades mínimas de otros ésteres de alcoholes de cadena larga, suponen al menos un 90% del espermaceti. En la proporción restante se pueden encontrar triglicéridos de los ácidos mirístico y palmítico, una pequeña cantidad de alcoholes (mayoritariamente cetílico y esteárico) y ácidos grasos libres (mirístico y palmítico) y trazas de hidrocarburos de C14 a C18 [30–32,35,36].

En vista de la complejidad de la composición del espermaceti, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha tomado como referencia la composición dilucidada por M. Wellendorf [31]:

- Laurato de cetilo: 15% (w/w)
- Miristato de cetilo: 37% (w/w)
- Palmitato de cetilo: 38% (w/w)
- Estearato de cetilo: 8% (w/w)
- Otros: 2% (w/w).

En las Figuras 2.5 a 2.8, que se muestran a continuación, se puede observar la estructura química de los cuatro componentes principales del espermaceti, que se obtienen de la esterificación entre el alcohol cetílico (1-hexadecanol) y los ácidos láurico (ácido dodecanoico), mirístico (ácido tetradecanoico), palmítico (ácido hexadecanoico) y esteárico (ácido octadecanoico).







Los ésteres cetílicos que componen el espermaceti son ampliamente utilizados en la industria cosmética y farmacéutica por separado, debido a que poseen propiedades emolientes, es decir, que suavizan la piel y las mucosas. En el sector farmacéutico se pueden encontrar en formulaciones para tratar el eczema y la psoriasis, la artritis o el síndrome del colon irritable, así como de excipiente y vehículo de transporte de principios activos [39–41]. En cosmética, por su parte, se utilizan como acondicionadores de la piel, surfactantes de champús, emulsionantes y agentes de consistencia en cremas, lociones y maquillajes [42,43]. En la Tabla 2.2 se recopilan algunas de las principales propiedades detalladas por los fabricantes de estos cuatro ésteres.

	Éster			
	Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo
Fórmula molecular	$C_{28}H_{56}O_2$	$C_{30}H_{60}O_2$	$C_{32}H_{64}O_2$	$C_{34}H_{68}O_2$
Productor	Venus Ethoxyethers Pvt. Ltd. [43]	Yasho Industries Pvt. Ltd. [44]	Fine Organics Industries Pvt. Ltd.[45]	Venus Ethoxyethers Pvt. Ltd. [46]
Apariencia	Copos blancos	Sólido céreo	Copos blancos	Copos blancos
Punto de fusión (°C)		54 - 56	50 - 60	
Número ácido (mg KOH/g muestra)	≤3.0	≤3.0	≤3.0	≤3.0
Valor de saponificación (mg KOH/g muestra)	125 – 135	117 – 127 [47]	100 - 120	105 - 115
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)		≤0.5	≤3.0	
Humedad (%)	≤1	≤0.2	≤2	≤1

Tabla 2.2- Características fisicoquímicas de los principales ésteres del espermaceti.

2.1.4. Aplicaciones del espermaceti y sus derivados.

Las principales aplicaciones del blanco de ballena han ido variando a lo largo del tiempo según los avances tecnológicos y la disponibilidad de otros materiales. De este modo, en los primeros años de industria ballenera, el espermaceti era utilizado casi exclusivamente con fines medicinales. Durante esta época, era recomendado para curar un gran número de afecciones, especialmente en las que se producían procesos inflamatorios, y llegó a considerarse tan valioso que era vendido por su peso en plata. A lo largo de los siglos XVIII y XIX sus aplicaciones en medicina pasaron a un segundo plano y fue mayoritariamente utilizado en la elaboración de velas de gran calidad, hasta que fue sustituido por las parafinas. Con la popularización del uso de cosméticos en todas las clases sociales a principios del siglo XX, se comenzó a considerar como un elemento esencial de las formulaciones cosméticas, especialmente en las "cold-cream", cremas untosas con propiedades calmantes e hidratantes [16,19,48].

En la actualidad, las principales funciones del blanco de ballena son las que se describen a continuación.

• Cosmética

Al igual que los ésteres que lo componen, el espermaceti es un emoliente de consistencia dura, por lo que se puede encontrar en una gran variedad de productos cosméticos como agente de protección y/o estructural. Además, aporta opacidad y brillo a las formulaciones y permite incorporar principios activos y fragancias, así como regular la dureza, punto de fusión y facilidad de aplicación del producto. Como parte de la fase oleosa de las emulsiones cosméticas, puede servir para ajustar la viscosidad y mejorar las propiedades hidratantes de cremas y lociones. En estado sólido, actúa como estructura y soporte para los aceites líquidos de barras de labios y para ayudar a la fijación de maquillajes en polvo [49,50].

• Farmacia

Debido a su semejanza con la seborrea de la piel humana y a sus propiedades emolientes, se utiliza en productos de aplicación externa, como las cremas para el tratamiento de problemas cutáneos. Asimismo, el blanco de ballena se emplea como excipiente de principios activos y actúa como soporte y dispensador lento de fármacos dentro del organismo, por lo que puede ser utilizado en la fabricación de comprimidos y supositorios [51–54].

• Lubricantes industriales

Al igual que los aceites vegetales ricos en triglicéridos, el espermaceti tiene excelentes propiedades lubricantes pero, a diferencia de éstos, es capaz de soportar altas presiones y temperaturas sin llegar a descomponerse. En consecuencia, el espermaceti puede emplearse como lubricante base o aditivo de lubricantes industriales de alta calidad, como los que se usan en los motores de acorazados [55,56].

• Imagen

Debido a su temperatura de fusión y a sus propiedades lubricantes, se puede encontrar un buen número de patentes relacionadas con grandes empresas de la imagen digital y la fotografía, en las que se utiliza el espermaceti en la fabricación y lubricación de cintas de grabación de imagen y datos, así como de tintas para impresión [57–60].

2.1.5. Alternativa natural al blanco de ballena.

Tras la prohibición global de la caza comercial de ballenas, se puso de manifiesto la necesidad de buscar una alternativa al espermaceti, destacando entre las opciones naturales el aceite de jojoba, que se extrae de la semilla de la *Simmondsia chinensis*. Este arbusto de hoja perenne es originario del Desierto de Sonora, que está localizado entre el noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos, aunque su cultivo es viable en la mayor parte de zonas semiáridas del mundo ya que soporta bien las sequías y es muy adaptable.

A pesar de tener aplicaciones comerciales similares, las propiedades fisicoquímicas de este compuesto difieren a las del blanco de ballena. El aceite de jojoba es una cera líquida a temperatura ambiente y es prácticamente inodoro e incoloro. Se compone mayoritariamente de ésteres insaturados de entre 38 y 44 carbonos derivados del ácido 11-eicosenoico (ácido C20:1 de la serie ω -9) y del 11-eicosenol y del 13-docosenol (alcohol C22:1 de la serie ω -9), con cantidades menores de otros ésteres del ácido 9-octadecenoico (ácido C18:1 de la serie ω -9) y del ácido 13-docosenoico.

El principal inconveniente en la obtención del aceite de jojoba reside en que el ciclo de reproducción de la *Simmondsia chinensis* es muy lento, de forma que se requiere un mínimo de cinco años para que la planta dé fruto. En consecuencia, su producción es muy limitada y supone una inversión a medio y largo plazo, por lo que el precio del aceite de jojoba es elevado y, hoy en día, su uso está circunscrito exclusivamente al campo de la farmacia y de la cosmética [61–65].

2.2. El sector cosmético y la formulación de productos.

2.2.1. Situación actual del mercado de la cosmética.

La búsqueda de la belleza a través de la cosmética es casi tan antigua como el propio ser humano. Existen evidencias alrededor de todo el mundo del uso de cosméticos con fines ornamentales, rituales o de cuidado personal desde tiempos inmemoriales. Por citar algunos ejemplos, se conoce que en el Egipto faraónico se elaboraban pomadas para suavizar su piel y tintes para adornar la cara, el cuerpo y el cabello 10000 años a.C., que los chinos ya pintaban sus uñas en el 3000 a.C. o que el apelativo de "pictos" para una antigua tribu escocesa coetánea al Imperio Romano podría tener su origen en la costumbre que tenían de pintarse o tatuarse la piel, posiblemente para la batalla [66].

Aunque la cosmética ha ido evolucionando a lo largo de la historia en función de la cultura, el concepto de belleza o la religión, fue durante el siglo XX cuando se produjeron los mayores progresos en el sector gracias a la aparición de nuevos materiales que permitieron la diversificación de los cosméticos y sus funciones, haciéndolos también más seguros [67,68].

La relación entre la higiene y la salud, el valor integrador del cuidado personal y el incremento de la autoestima son aspectos relacionados con la calidad de vida. Diversos estudios han demostrado que la cosmética tiene un impacto positivo en el bienestar, autoimagen y estado de ánimo de los usuarios, que en muchos casos consideran que el uso de cosméticos contribuye a mejorar su vida social, sentimental, familiar y profesional [69–71].

Además se ha observado que mantener hábitos de higiene fundamentales como lavarse las manos con jabón disminuye considerablemente el riesgo de padecer diarreas (una de las principales causas de muerte infantil) y parásitos intestinales, o que el uso diario de cremas solares puede reducir hasta en un 73% las probabilidades de desarrollar un melanoma invasivo [72,73].

Por lo tanto, actualmente, el término cosmético no se limita a los productos para la decoración de la piel, sino que hace referencia a una amplia gama de artículos relacionados con la higiene, la salud y la estética. Cualquier persona es un usuario potencial de cosméticos, independientemente de su edad, sexo, origen o profesión y en consecuencia, la cosmetología se ha convertido en un campo multidisciplinar, con un alto grado de especialización y siempre en constante renovación. Así, las grandes firmas del sector reformulan entre un 25 y un 30% de sus productos cada año, lo que se refleja en que, por ejemplo, en 2014 las empresas cosméticas de Europa invirtieran un total de 1270 millones de euros en I+D+i, y que hubiera más de 26000 científicos entre los 179000 empleos directos generados en dicha industria [71].

Con el fin de satisfacer las expectativas de los diferentes tipos de consumidores, se pueden encontrar un sinfín de consistencias en los productos cosméticos (suspensiones, polvos, geles, pastas, emulsiones, etc.) que se comercializan bajo distintos formatos, tales como sprays, roll-on, lápices, espumas o toallitas entre otros. Esta gran variedad ha dado lugar a diversos criterios de clasificación para los cosméticos, aunque, sin lugar a dudas, la más utilizada es la que se basa en la función del producto. Atendiendo a este criterio, se pueden diferenciar en cinco grandes familias:

- Perfumes y fragancias, categoría que agrupa aceites esenciales, colonias y perfumes en forma de bálsamo o stick.
- Cosmética decorativa, que engloba todo tipo de maquillajes, como pintura de uñas, lápices de labios, sombras y mascarillas de ojos, coloretes, etc.
- Productos capilares, como son los champús, fijadores, serums, tintes o acondicionadores.
- Productos para el cuidado de la piel, en los que se incluyen, entre otros, los protectores solares, las arcillas, las cremas, las ampollas y mascarillas faciales o las lociones corporales.
- Productos de aseo y tocador, entre los que se encuentran jabones, dentífricos, desodorantes y antitranspirantes, productos para el afeitado o lociones limpiadoras.

Esta amplia variedad de productos conlleva que el propio perfil de los productores de cosméticos sea muy diverso en cuanto a dimensión y actividad, de forma que el tejido empresarial de este sector engloba tanto a pequeñas y medianas empresas (PYMEs) como a grandes multinacionales. Así pues, de las más de 5000 empresas manufactureras de cosméticos que hay en Europa, 4900 son PYMEs o microPYMEs, y el comercio de productos e ingredientes cosméticos entre los diferentes países de la UE30 movió más de 33000 millones en 2016. Como se puede constatar en la Tabla 2.3, en ese mismo año, el mercado de la cosmética europea fue valorado en unos 77000 millones, de modo que a día de hoy es el más importante del sector. Por volumen de mercado, le siguen el estadunidense con 64000 millones de euros, el chino (41000 millones de euros), el brasileño y el japonés, que están en torno a los 24000 y 22000 millones de euros respectivamente [71].

Tipo de producto	Perfumes y fragancias	Cosmética decorativa	Productos capilares	Cuidado de la piel	Aseo y tocador
Volumen de mercado en Europa (millones de euros)	12100	11000	14700	19700	19200

Tabla 2.3- Principales categorías cosméticas y su volumen de mercado en Europa durante 2016 [71].

A pesar de la crisis económica, la producción y comercialización de cosméticos continúa siendo un sector de primer nivel en España. En 2016, el volumen de consumo de productos de cosmética y perfumería en nuestro país ascendió a unos 6657 millones de euros, lo que le convierte en el quinto mercado de Europa tras Alemania, Reino Unido, Francia e Italia. Los españoles gastan unos 144 € por habitante y año en productos cosméticos, lo que nos sitúa por encima de la media europea, y existen más de 250000 referencias cosméticas notificadas a las autoridades sanitarias españolas [69,71].

Como se puede ver en la Figura 2.9, estos artículos llegan al usuario a través de diversos canales, produciéndose casi el 50% de las ventas en grandes almacenes y supermercados (canales de gran consumo). Aunque el comercio electrónico sólo representa una proporción pequeña de las ventas totales de este tipo de productos, se espera que la venta en línea crezca sustancialmente en los próximos años [69].



Figura 2.9- Importancia de los canales de distribución de cosméticos en España en 2015 [69].

España es además uno de los seis principales suministradores de cosméticos a nivel mundial, siendo su volumen de exportación total de 3536 millones de euros en 2016, lo que supone un aumento de más de 1000 millones con respecto a 2010 y mantiene el balance positivo que viene experimentando el sector desde hace diez años. De este modo, se pueden encontrar cosméticos de fabricación española en más de 150 mercados extranjeros, siendo Francia y Portugal los países a los que se dirige el grueso de nuestras exportaciones, un 47%. Otros mercados de gran importancia para los productores de cosméticos de nuestro país son Alemania, Italia, EEUU, Emiratos Árabes Unidos, México, Chile y Rusia [69].

2.2.2. Legislación en cosmética.

Teniendo en cuenta que los cosméticos son productos que entran en contacto directo con una o diversas partes del cuerpo, es indispensable que exista una normativa adecuada para regular su composición, comercialización y etiquetado, y que asimismo determine de una manera clara quiénes son los responsables legales de los productos que hay en el mercado.

2.2.2.1. Marco jurídico de los productos cosméticos.

El pilar fundamental de la regulación en materia cosmética es el Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009. Este reglamento entró completamente en vigor el 11 de julio de 2013 con el fin de actualizar y aunar la Directiva 76/768/CEE y sus numerosas modificaciones en una sola normativa, de forma que no existan divergencias en los requisitos legales de cada país miembro y que éstos se apliquen al mismo tiempo en toda la Comunidad Europea. De una manera muy similar a la antigua directiva, el reglamento establece que, legalmente, un cosmético es:

"toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales" [74].

Por lo tanto, la legislación actual excluye a los productos cuyo fin sea la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como a los que están destinados a ser ingeridos, inhalados, implantados o inyectados en el cuerpo humano. Tampoco se considera como cosmético a los preparados destinados a proteger de la contaminación o infección por microorganismos, hongos o parásitos.

Se ha de tener especial precaución igualmente con no confundir desde un punto de vista legal las denominaciones "cosmético" y "producto de cuidado personal", ya que, según el artículo 8 de la Ley 10/2013, se entiende por este último tipo de productos las:

"sustancias o mezclas que, sin tener la consideración legal de medicamentos, productos sanitarios, cosméticos o biocidas, están destinados a ser aplicados sobre la piel, dientes o mucosas del cuerpo humano con finalidad de higiene o de estética, o para neutralizar o eliminar ectoparásitos" [75].

Ejemplos de artículos englobados en esta categoría, serían las tintas para realizar tatuajes, los productos dentífricos hiperfluorados para uso profesional, las mascarillas estéticas de abrasión por vía química o los productos para masaje deportivo, entre otros.

Dentro del ámbito legal de la cosmética, también es el Reglamento (CE) nº 1223/2009 el que define los principales actores de la cadena de suministro de cosméticos. En él se introduce la figura de "persona responsable" como la persona o empresa que ha de velar por que el producto cosmético cumpla con todos los requisitos dictaminados en esta normativa en lo que se refiere a seguridad, buenas prácticas de fabricación o etiquetado, entre otros, de forma que ningún cosmético puede ser comercializado en la Unión Europea sin que se haya designado claramente a la persona responsable del producto (artículo 4). Según el artículo 11, la persona responsable debe asimismo elaborar un expediente de información sobre cada producto que ponga en el mercado, y éste debe estar disponible para las autoridades competentes hasta diez años después de la salida del último lote. Además, este expediente debe contener un informe detallado sobre la seguridad del cosmético que cumpla con las pautas indicadas tanto el Anexo I del reglamento, como en la Decisión de Ejecución de la Comisión de 25 de noviembre de 2013 sobre las directrices de dicho anexo [74,76].

Otra de las funciones del Reglamento de 30 de noviembre de 2009 es la de prohibir la experimentación con animales (artículo 18) así como la de vetar o restringir el uso de determinados compuestos a la hora de formular un cosmético. Tanto el listado de los ingredientes prohibidos o cuya cantidad se encuentra limitada, como el de colorantes, conservantes y filtros ultravioleta permitidos y sus condiciones de uso se pueden consultar en los anexos de esta norma. Dichas restricciones son actualizadas periódicamente conforme a los avances técnicos y están recogidas en reglamentos posteriores aparecidos a este fin, aunque existe una versión refundida del Reglamento (CE) nº 1223/2009 con fecha del 14 de abril de 2015 para aunarlos [74].

Asimismo, el artículo 19 del reglamento determina cómo debe ser el etiquetado de los productos cosméticos, de manera que sólo se comercializarán en la Unión Europea si en su recipiente y su embalaje aparece con letra indeleble y fácilmente legible la siguiente información [74]:

- el nombre o la razón social y dirección de la persona responsable,
- el contenido nominal, en peso o en volumen,
- fecha de duración mínima del producto,
- precauciones particulares de empleo,
- lote de fabricación o referencia que permita identificar el artículo,
- función del cosmético, salvo si es posible deducirla por su presentación,
- lista de ingredientes por orden decreciente de importancia en el momento de la incorporación al producto.

En lo que respecta a las reivindicaciones de los preparados cosméticos, es decir a la información sobre las cualidades y características de un producto facilitadas para conseguir que se distinga del resto, es el Reglamento (UE) nº 655/2013 de 10 de julio de 2013 el que las regula. Esta normativa complementa al reglamento anteriormente descrito, y tiene como principal función proteger al usuario medio de engaños, de forma que pueda escoger de manera fiable y con cierto criterio los artículos que mejor podrían satisfacer sus necesidades y expectativas [77].

A pesar de que fue parcialmente derogado al entrar en vigor Reglamento (CE) nº 1223/2009, a nivel nacional siguen vigentes ciertas partes del Real Decreto 1599/1997 sobre regulación de cosméticos, como las que atañen a la lengua de etiquetado de los productos o la fabricación de cosméticos en farmacias [78].

Por último, el régimen de infracciones y sanciones aplicables en lo relativo a los productos cosméticos está regulado en el Real Decreto Legislativo 1/2015 de 24 de julio. Éste distingue entre infracciones leves, graves y muy graves según el riesgo que represente para la salud, la cuantía del posible beneficio obtenido al cometerla, el nivel de alteración sanitaria y social producida, la generalización de la infracción y la reincidencia [79].

2.2.2.2. Regulación de la cosmética natural.

Desde hace unos años la sociedad está experimentando un interés creciente por los productos elaborados a partir de sustancias de origen natural. Las denominaciones "orgánico", "bio", "natural" o "ecológico" resultan ser un reclamo cada vez más efectivo en sectores tan variados como el alimentario, el textil, el turismo o los combustibles. No es de extrañar pues que este tipo de calificativos se empleen con éxito en el marketing cosmético, ya que el consumidor suele percibir la cosmética natural como más segura, saludable y respetuosa con el medio ambiente.

A diferencia de lo que ocurre en el campo de la alimentación, la cosmética natural se rige únicamente por la legislación descrita en el apartado anterior ya que no existe una propia para ella. A día de hoy, aún se está trabajando en el documento que unifique el empleo de los términos "natural" y "orgánico" dentro del sector cosmético, la norma: ISO 16128. Por ello, durante estos últimos años, la Comisión Europea ha adoptado la definición de cosmético natural propuesta por la Comisión de Expertos en Productos Cosméticos en el año 2000, en la que se estipula como:

"un producto formado por sustancias naturales de origen botánico, mineral o animal, obtenido exclusivamente mediante métodos físicos (extrusión, centrifugación, filtración, destilación, extracción, percolación, técnicas de adsorción, congelación y secado), enzimáticos o microbiológicos. La extracción se puede llevar a cabo con agua, etanol o cualquier otro disolvente adecuado y de origen natural" [80,81].

Muchos productos cosméticos, especialmente los más sofisticados, no pueden formularse íntegramente utilizando ingredientes que cumplan estos requisitos, por lo que se incluyen excepciones para ciertas fragancias y conservantes, que deben estar claramente indicados en la etiqueta cerca de la indicación "natural". También están permitidos algunos emulsionantes obtenidos a partir de sustancias naturales mediante hidrólisis, esterificación o interesterificación con la misma salvedad anterior [81].

De acuerdo con la definición de cosmético natural, se pueden distinguir seis grandes tipos de ingredientes según su origen: vegetales, animales, minerales, marinos, de síntesis (muchos de los cuales están prohibidos en cosmética natural) y de origen biotecnológico [82]. Aunque en las sustancias provenientes de este último tipo de procesos generalmente no son aceptadas si el microorganismo que se ha utilizado era genéticamente modificado (GMO), sí está permitido utilizar enzimas provenientes de GMO como biocatalizadores, siempre que éstas hayan sido previamente purificadas y no se pueda encontrar trazas de los GMO en el producto final [83]. De esta forma se pone de manifiesto la oportunidad y el interés de obtener los aditivos más comunes en la formulación cosmética a través de procesos enzimáticos, ya que éstos contribuirían favorablemente en la consecución del calificativo "natural" en el cosmético acabado.

Por otra parte, cabe destacar que un cosmético orgánico es aquel que contiene ingredientes naturales procesados con arreglo a los métodos de cultivo orgánico o silvestre controlado que establecen las legislaciones de cada país [69,80].

La ausencia de una normativa propia a seguir en lo que respecta a la fabricación, comercialización y etiquetado de este tipo de cosméticos en de los diferentes países de la Unión Europea dio lugar al nacimiento de empresas de certificación independientes. Si bien los criterios para garantizar el carácter de natural o ecológico del cosmético varían de un organismo a otro, todos coinciden en unas bases comunes [84]:

- La cantidad mínima de ingredientes naturales o de origen natural debe ser de al menos un 90%.
- Se establece un porcentaje de ingredientes no naturales permitidos, que debe ser mínimo.
- Se precisa si el agua ha de tenerse en consideración para el cálculo del contenido parcial de ingredientes en el producto.
- Se indican los ingredientes permitidos y/o prohibidos (generalmente en forma de listado), ya que no puede contener compuestos sobre los que existan dudas sobre su inocuidad para las personas o el medio ambiente o ingredientes de origen animal si éstos son amputados o sacrificados específicamente para la elaboración del cosmético.
- Se prohíbe la realización de ensayos en animales con el producto final o los ingredientes que lo componen.
- Se excluyen o regulan ingredientes o procesos que impliquen el uso de tecnologías controvertidas, como los organismos modificados genéticamente o la nanotecnología. Tampoco se permiten tecnologías agresivas, como la irradiación del producto.
- Se incentiva la aplicación de los principios de la química verde durante todo el proceso de producción (el ahorro de energía, reducción y reciclado de desechos, utilización de menos embalajes y que éstos sean eco-responsables,...).

En la Figura 2.10 se recopilan los logotipos de algunas de las entidades certificadoras más importantes de varios países europeos en lo que respecta a cosmética natural. Estos organismos pueden estar o no especializados únicamente en la certificación de cosméticos orgánicos y naturales, y cada certificado tiene sus propias singularidades. Como es lógico, el hecho de obtener dicha mención no es incompatible con obtener certificados de entidades afines, como certificadoras de agricultura ecológica para las materias primas o de los sistemas de calidad.

El hecho de que Europa sea a efectos prácticos un solo mercado y de que no exista una legislación propia para este tipo de productos hizo que en 2002 cinco de las principales

certificadoras europeas (Ecocert, Cosmebio, ICEA, Soil Association y BDIH) se unieran para armonizar sus estándares, creando la asociación COSMOS-standard AISBL en 2010. Lo mismo sucedió con algunas de las empresas pioneras en la fabricación de cosméticos naturales, que se unieron en 2007 para fundar su propio sello, Natrue. Actualmente, estos dos consorcios, junto la Asociación Cosmética Europea, entre otros, son parte del comité de expertos encargado de la ISO 16128 [85].



Figura 2.10- Logotipos de las principales certificadoras de cosmética natural en Europa.

2.2.3. Formulación cosmética y rol de los emolientes.

Como se ha visto en el Apartado 2.2.1, la cosmética es un sector que mueve miles de millones cada año y cuyo negocio se extiende alrededor de todo el mundo. Cada día las exigencias de los distintos tipos de consumidores impulsan la creatividad de los fabricantes a la hora de desarrollar productos de mayor calidad y eficacia, y puesto que existe la posibilidad de elegir entre un sinfín de formulaciones y marcas, sólo sobrevivirán a un mercado altamente competitivo las empresas cuyos productos cumplan mejor con las expectativas y anhelos de los usuarios.

Puesto que el cometido de los cosméticos puede ser muy distinto, lógicamente también lo será su composición. Sin embargo, ésta no está determinada íntegramente por su función principal, sino también por una serie de atributos secundarios deseables para que el uso del producto sea gratificante y lo diferencie del resto de artículos. Así, de un champú no sólo se espera que limpie el cuero cabelludo, sino que además tenga un gran poder espumante, que sea fácil de aclarar y que no se vea afectado por la dureza del agua, mientras que de un barniz de uñas, aparte de aportarles color y brillo, se requiere que no se desconche, que tenga un secado rápido y que no tiña la uña. Por lo tanto, los principios activos encargados de conseguir el resultado prometido han de ser incorporados en un vehículo cosmético adecuado, de forma que mantengan su actividad y puedan ser aplicados con facilidad y de forma agradable. Así pues, la formulación en cosmética es todo un despliegue de saber hacer: el cosmetólogo no sólo debe conocer profundamente los múltiples ingredientes, sino también las interacciones entre ellos y el efecto que producen con el fin de conseguir los beneficios reivindicados [68].

Las emulsiones son la forma cosmética empleada mayoritariamente en los productos destinados al cuidado de la cara y la piel, artículos que por su peso económico juegan un papel fundamental en el sector cosmético [68,71]. Una emulsión es la mezcla de dos o más líquidos inmiscibles, para obtener una dispersión más o menos grosera de uno en otro. Por lo tanto, es un sistema termodinámicamente inestable y se suele requerir de un aporte de energía (normalmente mecánica) para formarla, así como de tensioactivos (emulsificantes) para evitar su separación con el paso del tiempo. En cosmética, una emulsión puede estar constituida por una fase oleosa dispersa en una acuosa (O/W), una fase acuosa dispersa en una oleosa (W/O) o una mezcla de silicona en agua. Existe además un interés creciente por las emulsiones múltiples, como la agua/aceite/agua (W/O/W) o aceite/agua/aceite (O/W/O). En ellas, la fase dispersa contiene gotas de la misma naturaleza que la fase continua, por lo que se pueden describir como una emulsión dentro de otra. Por otra parte, según su fluidez, las emulsiones cosméticas son denominadas leches o lociones cuando se pueden verter con facilidad y cremas cuando son semisólidas [68,86].

El comportamiento, estabilidad, y propiedades de una emulsión cosmética vienen determinados por las decisiones que toma el formulador respecto a una serie de aspectos tan básicos como los que se describen a continuación.

Composición

De la composición de la emulsión dependerá tanto que el cosmético cumpla con su función como que se garantice una resistencia adecuada a los agentes medioambientales y microbiológicos que lo rodean [86]. Por lo general, una crema o loción contiene uno o varios principios activos, las substancias que componen las distintas fases de la emulsión, fragancias, colorantes, agentes conservantes y emulsificantes, y es de gran importancia que estos ingredientes contribuyan a obtener una emulsión estable. No obstante, esto depende en gran medida de los emulsionantes, que suelen ser moléculas anfipáticas de naturaleza iónica o no [68]. Para facilitar su elección, dichos tensioactivos están clasificados siguiendo el método de balance hidrofílico - lipofílico (HBL), en el que un valor numérico asignado a cada emulsionante indica su comportamiento lipófilo (valores bajos) o hidrófilo (valores altos) [87].

• Tipo de emulsión

Al formular una emulsión, el emulsificante empleado condicionará fuertemente cuál será la fase que actuará como dispersa y cuál como continua [87]. El tipo de emulsión resultante influye a su vez en la liberación de los principios activos en la piel, en la conservación de la formulación, así como de la sensación que experimenta el consumidor al aplicar el producto. De este modo, las emulsiones de aceite en agua son más ligeras al tacto, se extienden fácilmente, presentan una mayor estabilidad física y su proceso de fabricación es más sencillo, mientras que las emulsiones agua en aceite tienen mayor efecto hidratante, aportan más brillo a la piel y son menos propensas a la acción microbiana. Las emulsiones múltiples, por su parte, suelen percibirse como menos grasas, permiten atrapar sustancias en su fase interna e incluir ingredientes incompatibles en las diferentes fases de la emulsión [68].

• Tamaño de la gota

El tamaño de las gotas de la fase dispersa es muy importante en la estabilidad, apariencia y textura de una emulsión. Las emulsiones pueden clasificarse según la capacidad que tienen dichas gotas para dispersar la luz que incide en ellas. Las macroemulsiones son las que tienen una distribución de gotas polidispersa de tamaño superior a 500 nm, lo que hace que reflejen la luz visible y se perciban como opacas. Las microemulsiones, por su parte, presentan tamaños de gota de entre 20 y 200 nm y tienen una apariencia translúcida o transparente. Generalmente, una distribución de gotas de tamaño pequeño y similar conferirá a la emulsión una mayor estabilidad, por lo que las microemulsiones suelen tener una mayor vida media que las macroemulsiones. Asimismo, existen las denominadas emulsiones submicrónicas, que aunque parecen opacas al ojo humano, poseen un tamaño de gota menos heterogéneo que las macroemulsiones y que puede ser lo suficientemente pequeño para permitir la filtración (100 - 300 nm) [86,88].

• Viscosidad

Un ajuste adecuado de la viscosidad de la emulsión es otro factor a tener en cuenta a la hora de mejorar su extensibilidad sobre la piel y su consistencia, pero también su estabilidad, ya que con el paso del tiempo se pueden dar fenómenos de migración, floculación y coalescencia de las gotas de la fase dispersa. Dicho fenómeno ocurre especialmente en las emulsiones de aceite en agua, en las que las gotas de fase oleosa tienden a ascender dentro de la emulsión, proceso denominado como "creaming". Para prevenirlo, se recomienda aumentar la viscosidad de la fase continua, la acuosa, gracias a la adición de espesantes como carbómeros (polímeros del ácido acrílico) o de gomas celulósicas. En lo que respecta a las emulsiones de agua en aceite, su estabilidad depende casi exclusivamente de la viscosidad de su fase continua, y ésta está relacionada a su vez con las propiedades de los emolientes que la constituyen. Así, se ha observado que los que más estabilidad confieren a la emulsión son los emolientes que presentan una polaridad media o los de mayor peso molecular cuando van acompañados de coemulsionantes también de elevado peso [68,86,89].

• pH

El pH superficial de la piel juega un rol importante en su fisiología, ya que interviene en la composición de los lípidos y en la hidratación del estrato córneo, en la actividad enzimática y función barrera de la piel y en los microorganismos que constituyen su flora natural. El pH de la piel es ligeramente ácido, entre 5.4 y 5.9, aunque se pueden dar variaciones dependiendo del sexo y la etnia de una persona, e incluso para un mismo individuo, según la parte del cuerpo estudiada. Para mantener una piel sana se debe hacer uso de cosméticos que no alteren el pH de la piel ni afecten su flora, evitando las formulaciones que produzcan un pH demasiado alcalino, ya que se ha demostrado que un aumento del pH de la piel está asociado con trastornos cutáneos como el eczema, la dermatitis, el acné o las infecciones por *Candida albicans*. Asimismo, el pH de las emulsiones debe de ser el adecuado para garantizar el buen funcionamiento del agente conservante y preservar su acción antimicrobiana, así como para evitar la hidrólisis de los ésteres utilizados en la formulación [68,86].

Tan importante como que la emulsión cosmética cumpla con sus funciones de manera eficaz, es que la experiencia sensorial del consumidor al utilizarla sea placentera, ya que éste es un factor determinante en la fidelización del cliente. Como consecuencia, en las últimas décadas se ha desarrollado un gran interés por entender qué características fisicoquímicas del producto son las responsables de sensaciones tan subjetivas como que el cosmético sea protector, pegajoso, no graso o consistente. Aunque resulta extremadamente complicado establecer unas pautas de comportamiento general, cada vez se publican más trabajos que intentan relacionar las propiedades organolépticas de una emulsión (evaluadas mediante expertos en análisis sensorial) con ciertos parámetros determinados en ensayos reológicos (módulos elástico y viscoso, valor de la viscosidad para diferentes fuerzas de cizalla, etc.), de textura (variación de la fuerza con el tiempo en ensayos de compresión, penetración, extrusión o deslizamiento) o de evaluación de su microestructura (tamaño, forma y distribución de las gotas, temperaturas de fusión y cristalización de los ingredientes,...). Un aspecto muy interesante de este tipo de estudios es que pueden llevarse a cabo con el fin de dilucidar el comportamiento general de una crema o para estudiar la influencia de un ingrediente concreto dentro la formulación, siendo de especial interés determinar el efecto de los emolientes [90-96].

Como se ha mencionado en el Apartado 2.1.3, los emolientes son compuestos químicos capaces de ablandar, suavizar y proteger la piel y las mucosas, así como de reducir sus inflamaciones. Mientras que los humectantes son sustancias higroscópicas que atraen y retienen la humedad sobre la piel, como la glicerina o el propilenglicol, los emolientes crean una capa oclusiva o semioclusiva sobre el estrato córneo que evita la evaporación del agua y la sensación de picor de la piel seca. Proteger y restaurar la función barrera de la piel mediante el uso de emolientes previene la acción de alérgenos, irritantes y bacterias, lo que conlleva la reducción del riesgo de desarrollar eczemas. Además, los emolientes pueden utilizarse como excipientes para solubilizar principios activos o para la dispersión de compuestos insolubles, como algunos pigmentos, por lo que no sólo se encuentran en cremas y lociones, sino también en protectores solares, limpiadores faciales, champús o barras de labios, entre otros [68,89,97].

Generalmente, los emolientes son el principal componente de las emulsiones destinadas al cuidado de la piel tras el agua, y constituyen entre un 3 y un 20% en peso de estos productos. La elección del tipo y cantidad de emoliente a utilizar depende de su compatibilidad con el resto de compuestos de la formulación, de la estabilidad de la emulsión en sí misma, así como de la sensación de suavidad sobre la piel que debe aportar el cosmético. Desde el punto de vista químico, se pueden encontrar triglicéridos, hidrocarburos, derivados de siliconas, éteres y alcoholes grasos con propiedades emolientes, aunque son los ésteres los que mayor popularidad tienen debido a la gran versatilidad de sus prestaciones, su aplicabilidad y la posibilidad de obtenerlos de fuentes naturales [89–91,98].

Los ésteres emolientes son sustancias liposolubles, por lo que se encontrarán en la fase oleosa de la emulsión. Algunos de ellos son líquidos casi tan fluidos como el agua, que se extienden rápidamente en la piel (como los oleatos de decilo e isodecilo o el miristato de isopropilo), y otros son sólidos cerosos que funden a una temperatura próxima a la del cuerpo y dan "consistencia" a las cremas (por ejemplo, el ricinoleato de cetilo), de forma que cada éster le confiere diferentes propiedades a la emulsión según su estructura química y la longitud de su cadena [86].

Como se ha descrito previamente, la viscosidad de una emulsión cosmética se ve muy influenciada por el tipo de emoliente escogido, y por lo general, aumenta cuanto mayor es el peso molecular del éster, tanto si es lineal como si es ramificado. Dicho parámetro también está vinculado a la presencia de ciertos grupos funcionales en el éster, como los grupos hidroxilo, ya que les permiten interaccionar con las moléculas polares de la formulación aumentando así la viscosidad del producto. En términos generales, la extensibilidad del producto en la piel suele estar inversamente relacionada con la viscosidad. Así, por ejemplo, los ésteres ramificados presentan un factor de extensibilidad relativamente elevado, que disminuye al aumentar el peso molecular [68].

Por su parte, la temperatura de fusión de los ésteres lineales será mayor para longitudes de cadena grandes, lo que ésta relacionado con la consistencia y resistencia térmica de la crema o loción. Otros parámetros interesantes a determinar son el ángulo de contacto, tensión interfacial y polaridad del éster, ya que éstos están relacionados con la extensibilidad, la facilidad para la emulsificación y el poder de penetración en la piel de la emulsión [90,91,98].

En lo que respecta a la percepción sensorial del usuario al utilizar el cosmético, se ha observado que un mono-éster simple, obtenido de un ácido y un alcohol de cadena corta, proporciona una sensación ligera, mientras que los ésteres ramificados se percibirán como no grasos y los ésteres más complejos o de mayor longitud de cadena como que aportan "confort y protección" [68].

Por último, cabe destacar que además de su función como emolientes, los ésteres se pueden emplear en cosmética como acondicionadores de la piel, disolventes, fragancias y conservantes [68].

2.3. Biocatálisis industrial.

2.3.1. Ventajas de los procesos enzimáticos aplicados a la industria.

Con la amenaza inminente del cambio climático y una población mundial estimada en 2015 por la ONU de 7.3 billones de personas y en pleno crecimiento, probablemente uno de los principales desafíos de la industria química para el siglo XXI sea el desarrollo sostenible de bienes y sistemas productivos competitivos en una economía de mercado cada vez más abierta [99]. Según el Informe Brundtland, se entiende por sostenibilidad el conjunto de acciones que satisfacen las necesidades de la sociedad actual sin comprometer el bienestar de las generaciones futuras [100]. Dichas acciones deben tener un triple impacto positivo: social, económico y medioambiental, por lo que los nuevos procesos industriales deben diseñarse no sólo con el fin de reducir las etapas de procesado y mejorar su rendimiento, sino también para ahorrar en el consumo de materias primas, energía, recursos y evitar la generación de contaminantes. De este modo, el concepto de desarrollo sostenible aplicado al mundo de la química industrial va íntimamente asociado con los "12 Principios de la Química Verde", enunciados por Anastas y Warner en 1998. En ellos, se insta a desarrollar rutas sintéticas en las que la reducción del uso de sustancias peligrosas y de la producción de residuos, la elección de catalizadores selectivos o la economía de átomo sean una prioridad [101].

Dentro de este marco, la utilización de procesos industriales biotecnológicos (o biotecnología blanca) se presenta como una alternativa prometedora a los sistemas productivos convencionales, ya que algunas de las propiedades inherentes de las células y de las enzimas hacen de ésta una tecnología limpia y respetuosa con el medio ambiente, a la par que innovadora y eficiente.

A pesar de que el ser humano se ha servido de células y enzimas desde la antigüedad para elaborar alimentos como el pan, el vinagre, la cerveza o el queso, el progreso de la bioquímica y la enzimología fue escaso hasta finales del siglo XIX, de forma que la gran mayoría de procesos biotecnológicos a nivel industrial eran (y continúan siendo) las fermentaciones. No obstante, el descubrimiento de nuevas enzimas y la aparición de la tecnología de ADN recombinante en 1978 han permitido un avance drástico de los biocatalizadores en las últimas décadas, y en la actualidad se entiende por biocatálisis la utilización en los procesos de producción de enzimas o células cuya fase de división se encuentra inactiva, mientras que las fermentaciones requieren microorganismos o células vivas [102,103].

Debido a la comprensión tardía de los mecanismos enzimáticos, aún existen muchos prejuicios a la hora de utilizar sistemas biocatalíticos para la elaboración de productos a gran escala. Uno de ellos es que las enzimas son activas para una pequeña cantidad de sustratos, o sólo para su sustrato natural, lo que es cierto para un número reducido de ellas, como la catalasa, que sólo acepta el peróxido de hidrógeno o los alquil-peróxidos. En realidad, la mayor parte de enzimas (y especialmente las de tamaño medio) tienen un amplio rango de

especificidad, e incluso algunas de ellas catalizan distintos tipos de reacciones, por lo que actualmente se puede desarrollar por vía enzimática casi todo el espectro de reacciones utilizadas en la química orgánica [104].

Otra creencia muy extendida es que las enzimas solamente pueden utilizarse en condiciones similares a las fisiológicas, puesto que son muy sensibles. Ciertamente, una de las principales ventajas de las enzimas, como es su capacidad de trabajar en condiciones de operación suaves, es también uno de sus puntos débiles, ya que no se debe olvidar que las enzimas son proteínas, por lo que para poder permanecer activas algunas requieren trabajar en medios acuosos y/o con temperaturas y pH moderados de forma que no se produzcan cambios conformacionales de su estructura terciaria y cuaternaria. Sin embargo, se ha demostrado que muchos biocatalizadores tienen actividad bajo condiciones extremas, como temperaturas de hasta 150 °C y presiones de 10 MPa [105], en medios no acuosos, como los disolventes orgánicos [106], fluidos supercríticos [107] o líquidos iónicos [108], e incluso en ausencia de disolventes [109].

Dado que, exceptuando a las proteasas por motivos obvios, las enzimas son compatibles unas con otras y una buena parte son activas bajo condiciones de operación similares, es posible llevar a cabo varias reacciones biocatalíticas en cascada en un mismo reactor. Los sistemas multienzimáticos, también denominados "metabolismos artificiales", son cada vez más reconocidos en el mundo científico por su gran potencial, ya que sus reacciones secuenciales son una alternativa viable para solucionar problemas de manejo de productos intermedios inestables y/o de equilibrios y cinéticas de reacción desfavorables. Un ejemplo de aplicación de estos sistemas sería la utilización de lipasas coinmovilizadas para mejorar la productividad y velocidad de la transesterificación de los aceites heterogéneos utilizados en la producción de biodiesel [110,111].

Las enzimas resultan ser por lo tanto unos catalizadores tremendamente efectivos cuando se utilizan de la forma y bajo las condiciones adecuadas, pudiendo acelerar la velocidad de reacción incluso en varios millones de veces, muy por encima de lo que un catalizador químico es capaz de conseguir. Además, las enzimas exhiben una alta selectividad, que se manifiesta a tres niveles [110]:

- Son capaces de actuar sobre grupos funcionales concretos, dejando intactos otros grupos que reaccionarían utilizando catalizadores clásicos (chemoselectividad).
- Pueden distinguir grupos funcionales químicamente idénticos pero posicionados en distintas partes del sustrato (regio- y diasteroselectividad).
- Son catalizadores quirales, por lo que puede transformar sustratos en productos ópticamente activos o permitir la resolución de mezclas racémicas, ya que ambos enantiómeros tendrán velocidades distintas de reacción (estéreo- y enantioselectividad).

Dicha especificidad hace de las enzimas unos catalizadores muy interesantes para la producción de compuestos de química fina, y especialmente de productos intermedios para el sector farmacéutico, como por ejemplo la síntesis del ácido DL-β-acetiltioisobutírico, un

precursor de un compuesto utilizado para el tratamiento de la hipertensión, el captropril, mediante una reacción de hidrólisis estereoselectiva catalizada por una esterasa [104,112].

La gran selectividad de las enzimas combinada con su capacidad para trabajar bajo condiciones de reacción casi ambientales, supone además una disminución considerable de las reacciones secundarias y de la generación de residuos. Los sistemas biocatalíticos requieren menos etapas de post tratamiento de los productos, reducen el consumo de energía y son más respetuosos con el medio ambiente. De este modo, mientras que los procesos productivos tradicionales conllevan la utilización de disolventes problemáticos, compuestos tóxicos y la generación de residuos difíciles de gestionar, se ha demostrado que los enzimáticos ayudan a reducir la contribución de la industria en el calentamiento global y en los fenómenos de lluvia ácida, eutrofización de las aguas y de generación de ozono fotoquímico ("smog"), como han corroborado diversos análisis de ciclo de vida e informes de impacto ambiental [113].

En la Tabla 2.4 se resumen algunas de las ventajas y desventajas del uso de los biocatalizadores enzimáticos.

Ventajas	Desventajas	
Gran selectividad (menos subproductos)	Posible requerimiento de cosustratos	
Buenos rendimientos	Inhibición enzimática	
Alta velocidad de reacción	Inestables a temperaturas y pH extremos	
Trabajan en condiciones de operación moderadas	Inestables en disolventes agresivos	
Bajo consumo de energía	Coste relativamente elevado	
Pueden ser producidas en grandes cantidades	Desarrollo científico de nuevas enzimas lento	
Biodegradables	Posibles alérgenos por inhalación o ingestión	

Tabla 2.4- Pros y contras de las enzimas frente a la catálisis tradicional [102,104].

A pesar de sus múltiples beneficios, la imposición de la biotecnología blanca frente a los procesos químicos clásicos todavía continua siendo un reto. Aunque ello implique grandes esfuerzos en la preservación medioambiental, los sistemas productivos que emplean catalizadores convencionales están bien afianzados en el tejido industrial de las naciones y particularmente en la industria de base, en la que la inversión en I+D+i escasea. Además, para que los sistemas biocatalíticos sean rentables desde un punto de vista económico, el beneficio global conseguido gracias a la reducción de las etapas de producción, consumo de energía, uso de sustancias auxiliares y de gastos en gestión de residuos deben superar la inversión en biocatalizador. En consecuencia, aparte de la actitud conservadora de algunos empresarios, el relativamente elevado coste de algunas enzimas resulta ser otro de los principales obstáculos en la implantación de procesos biocatalíticos, especialmente para la pequeña y mediana industria [114].

Afortunadamente, la concienciación medioambiental comienza a ser una realidad social, y gracias a los rápidos avances en biología molecular, los costos de la producción de enzimas son cada vez menores. Esto se ha reflejado en que la aplicación de la biocatálisis a gran escala se ha extendido de forma considerable en los últimos años, de forma que actualmente se pueden encontrar procesos enzimáticos dentro de la industria textil [115,116], alimentaria [117,118], papelera [119,120], farmacéutica [121,122], cosmética [123,124], o de los biocarburantes [125,126] entre otros (Tabla 2.5).

Producto	Enzima	Estado de la enzima	Empresa
Etanol (para combustibles)	Amilasa	Libre	Varias
Ésteres emolientes	Lipasa	Inmovilizada	Evonik
L-alanina	Aminoacilasa	Inmovilizada	Tanabe Seiyaku
Leche sin lactosa	β-galactosidasa	Libre/Inmovilizada	Varias
Acrilamida	Nitrilasa	Inmovilizada	Nitto Chemicals
Siropes de maíz ricos en fructosa	Glucosa-isomerasa	Inmovilizada	Varias
Insulina humana	Carboxipeptidasa A	Libre	Aventis Pharma
Manteca de cacao	Lipasa	Inmovilizada	Unilever
Aspartamo	Termolisina	Inmovilizada	Tosoh Corporation

Tabla 2.5- Ejemplos de sustancias producidas mediante biocatálisis [102].

Una de las formas de hacer los procesos biocatalíticos más rentables desde un punto de vista económico, es inmovilizar las enzimas para obtener formas insolubles de éstas, de forma que se pueda separar del producto con facilidad, recuperar y reutilizar tras su uso. El proceso de inmovilización supone una alteración de la conformación nativa de la enzima, de modo que puede dar lugar, en el peor de los casos, a una inactivación irreversible de la misma o por el contrario, a la estabilización de su estructura terciaria y cuaternaria y la mejora en sus propiedades. En muchas ocasiones, una enzima inmovilizada presentará una menor actividad biocatalítica que en su estado libre, pero una mejor resistencia a fuerzas mecánicas, a la temperatura y pH o a medios de reacción no convencionales [102]. Existen diferentes métodos para la inmovilización de enzimas, basados en procesos de retención física (atrapamiento en geles o fibras poliméricas, microencapsulación en membranas semipermeables e inclusión en membranas de ultrafiltración) o de unión química (inmovilización sobre soportes y entrecruzamiento de las enzimas por enlaces intermoleculares irreversibles entre ellas, o "cross-linking"), de forma que pueden utilizarse por separado o combinarse para producir biocatalizadores más eficientes [127,128].

El uso de derivados inmovilizados sobre soportes físicos permite diseñar reactores biocatalíticos eficaces y sencillos. Con ellos se puede trabajar en sistemas de tanque agitado, lecho fluidizado y lecho empaquetado, tanto en continuo como por lotes, por lo que para el desarrollo de esta Tesis Doctoral sólo se estudiarán los procesos de inmovilización sobre soportes, ya que a efectos prácticos, es la forma escogida mayoritariamente para el desarrollo de biocatalizadores industriales [127].

La inmovilización sobre soportes requiere que se establezcan enlaces químicos entre éstos y las enzimas. Dichas uniones pueden ser covalentes, de forma que se crea un enlace irreversible entre la enzima y un soporte químicamente activo, pero también pueden ser fuerzas débiles o enlaces iónicos los que mantengan una unión con el soporte más o menos resistente [127]. Por lo tanto, un protocolo de inmovilización eficaz será el resultado de la optimización de los factores que en él intervienen: naturaleza de la enzima, tipo de soporte escogido y medio por el que se realiza la inmovilización. En lo que respecta al soporte, éste puede ser de naturaleza inorgánica (basados en óxidos de silicio), polímeros naturales (polisacáridos como la celulosa o la agarosa) o sintéticos (poliestirenos, acrilatos o poliamidas, entre otros). Se suele preferir soportes con geometría regular (generalmente esférica), un tamaño de partícula homogéneo y un tamaño de poro lo suficientemente grande para albergar a la enzima, a los sustratos y a los productos, de forma que no se den grandes limitaciones difusionales tanto durante la inmovilización, como en los procesos biocatalíticos posteriores. Asimismo, es necesario controlar la temperatura, pH, fuerza iónica, concentración y tiempo de contacto entre las especies que participan en el proceso para poder garantizar un buen rendimiento de la inmovilización [102].

La adsorción es una técnica de inmovilización sencilla, rápida y de gran aplicabilidad. Permite enlazar una elevada cantidad de enzima sobre el soporte, y además puede aplicarse para inmovilizar células enteras. Las fuerzas de unión implicadas en los procesos de adsorción son diversas, como las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno o las interacciones iónicas, y pueden conseguir que en algunos casos las enzimas queden inmovilizadas con una orientación específica dentro del espacio que permite el soporte. Además, debido al carácter débil de estas fuerzas, durante la adsorción no se produce una modificación química significativa en la enzima, por lo que las pérdidas de actividad catalítica son por lo general bajas. Sin embargo, los procesos de desorción pueden ocurrir con facilidad, incluso debido a pequeñas variaciones en el pH o en la concentración de sustrato, producto y disolvente de un medio de reacción. Aunque por lo general, la mayoría de enzimas se adsorben más fácilmente sobre materiales con superficies polares, las lipasas prefieren los soportes hidrófobos debido a sus peculiares características fisicoquímicas, como se explicará en el Apartado 2.3.2. Así pues, los biocatalizadores elaborados por adsorción serán especialmente adecuados para trabajar en medios lipófilos, ya que el proceso de desorción será más complicado debido a la insolubilidad de las enzimas en estos medios [110,128].

Por su parte, la inmovilización por enlace covalente se basa en la reacción química entre los aminoácidos de la superficie de las enzimas y ciertos grupos funcionales del soporte. Mientras que la formación de enlaces estables entre la enzima y el soporte permite evitar los problemas de liberación de enzimas al medio, también suele conllevar una pérdida de actividad catalítica, que suele ser de hasta un 50% en la gran mayoría de casos. No obstante, a veces alterar la entidad química de la enzima y rigidizar su conformación mediante enlaces covalentes puede conllevar una mejora contundente de la estabilidad, actividad y selectividad de la enzima inmovilizada. Se debe considerar asimismo, que este tipo de inmovilización es sólo aconsejable para trabajar con enzimas, puesto que las condiciones drásticas de reacción que se requieren son inadecuadas para el mantenimiento de una estructura celular [110,128].

Los grupos funcionales implicados en los procedimientos por enlace covalente suelen ser nucleófilos, ya que la mayoría de residuos polares de las enzimas se encuentran en su superficie, a excepción de las lipasas, que poseen superficies hidrófobas. Por lo general, para llevar a cabo este tipo de inmovilización se precisa de un pretratamiento del soporte para introducir ciertos grupos químicos (denominados "spacers") que permitan proteger la enzima y hacerla más accesible en la superficie del soporte. Muchos de los protocolos empleados constan pues de dos etapas, la primera es la activación del soporte y la segunda la inmovilización la enzima. En la Figura 2.11 se describen los principales métodos para inmovilizar covalentemente una enzima, entre los que destacan el procedimiento que requiere la activación con glutaraldehído y el que se basa en resinas que contienen un grupo epóxido, ya que son los dos únicos que se emplean con éxito a nivel industrial. Concretamente, la inmovilización por enlace covalente utilizando una resina epóxida permite el desarrollo de protocolos más sencillos que en el resto de casos, ya que los epóxidos son bastante reactivos con los residuos nucleófilos de las enzimas, como son los grupos amino, tiol e hidroxilo [102,110].

Así, por lo general los métodos de inmovilización hacen que resulte mucho más práctico trabajar con enzimas que con células vivas, ya que las enzimas aisladas o parcialmente purificadas pueden ser manejadas de una forma semejante a un catalizador químico dentro de unos límites. Aunque las fermentaciones sean un proceso muy consolidado en la industria química y alimentaria, la utilización de microorganismos o células vivas a gran escala puede resultar engorrosa y difícil, incluso después de la introducción de la automatización y los sistemas de control en las plantas de producción [110]. Además, la catálisis enzimática permite aumentar el rendimiento de los reactores tanto en espacio como en tiempo de proceso, reduce el riesgo de que se produzcan reacciones indeseadas y presenta una mayor estabilidad que los sistemas microbiológicos. De este modo, las fermentaciones sólo resultan más atractivas, desde un punto de vista tecnológico, en las transformaciones que requieren secuencias de reacción complejas en rutas multienzimáticas (por ejemplo, la transformación del azúcar en alcohol), ya que es mucho más sencillo llevarlas a cabo con microorganismos capaces de realizar la síntesis de nuevas enzimas y la regeneración de sus cosustratos [102].



(a)





Figura 2.11- Inmovilización por enlace covalente sobre soportes inorgánicos (a), polímeros naturales (b) y polímeros sintéticos (c) [110].

2.3.2. Las lipasas: estructura y características.

Las lipasas, o triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), constituyen un conjunto de enzimas relacionada con el metabolismo y degradación de las grasas, ya que su función natural es la hidrólisis de los triglicéridos [129]. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como una baja concentración de agua en el medio, las lipasas son capaces de llevar a cabo reacciones de esterificación, interesterificación, alcohólisis, acidólisis y aminólisis [130–133].

Las lipasas actúan sobre una gran variedad de sustratos, aunque se las suele clasificar según su capacidad para hidrolizar los triglicéridos de forma que existen lipasas con distintas selectividades [129]:

- 1,3-específicas, que actúan preferentemente sobre los enlaces éster terminales para generar un 2-monoglicérido.
- No regioespecíficas, que atacan a cualquiera de las tres posiciones del triglicérido.
- Lipasas que presentan especificidad por los ésteres que contienen un doble enlace en las entre las posiciones C9 y C10 del ácido graso.

Actualmente se ha conseguido dilucidar la estructura de muchas lipasas por cristalografía de rayos X, observándose que todas presentan la estructura de pliegues α/β típica de las hidrolasas, que consiste en núcleo hidrófobo compuesto por varias láminas β paralelas y ancladas entre sí, rodeado de capas de hélices α anfifilicas (Figura 2.12).



Figura 2.12- Estructura de la lipasa de <u>*Pseudomonas fluorescens, en amarillo están representadas las láminas \beta y en lila las hélices \alpha [134].*</u>

La triada catalítica de las lipasas está compuesta por los aminoácidos serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp), aunque éste último es sustituido a veces por ácido glutámico (Glu). Las lipasas no requieren de cofactores y su mecanismo de acción es similar al de las esterasas. Como se puede ver en la Figura 2.13, éste se basa en la creación de dos intermedios tetraédricos entre el sustrato y la enzima. El primero de ellos, se debe al ataque nucleófilo de la serina catalítica y es estabilizado por la formación de enlaces de hidrógeno en una región denominada "hueco oxoaniónico", tras lo cual, el alcohol que componía el éster es liberado y se forma un complejo covalente entre la lipasa y el radical acilo. Éste es atacado por un nuevo nucleófilo para formar un segundo intermedio tetraédrico, que finalmente colapsa liberando el producto y la enzima [135]. Sin embargo, ambas enzimas se distinguen por su especifidad frente a los sustratos, ya que las lipasas son enzimas lipolíticas, por lo que prefieren ésteres de ácidos grasos de cadena media o larga, mientras que las esterasas actuarán en ésteres de ácidos de cadena corta. Según Pleiss et al., esta especificidad podría ser debida a la profundidad del sitio de unión entre la enzima y el radical acilo [102,135].



Figura 2.13- Mecanismo de acción de las lipasas [136].
Asimismo, mientras que las esterasas siguen una cinética tipo Michaelis-Menten, se ha constatado que la actividad de muchas lipasas es baja cuando su sustrato está disuelto en forma monomérica, pero que ésta aumenta radicalmente cuando se dan interfaces agua-lípido [110]. A este fenómeno se le conoce como activación interfacial y ha sido relacionado con el hecho de que el centro activo de las lipasas está cubierto parcial o totalmente por una de las hélices α de su estructura, de forma que ésta actúa como una especie de tapa móvil que se desplaza para permitir el acceso de los sustratos al centro activo cuando la enzima entra en contacto con una interfase lipídica (configuración abierta). Sin embargo, la existencia de dicho fragmento no explicaría completamente el proceso de activación interfacial, ya que por ejemplo, en la lipasa B de *Candida antarctica* el trozo de hélice α disponible no consigue aislar completamente el centro activo de la enzima y no muestra activación interfacial, pero tampoco se presenta en la lipasa de páncreas de coipo (un roedor similar al castor), a pesar de tener su triada catalítica cubierta por un residuo de 23 aminoácidos similar a las de otras lipasas pancreáticas que sí sufren este fenómeno. De este modo, actualmente se cree que la activación interfacial podría deberse no sólo a los cambios estructurales de la propia lipasa en las interfaces lípido-agua, sino también a las diversas conformaciones que adoptan los lípidos en el medio de reacción, a la composición del microentorno de la enzima y la interacción entre éstos [129,137].

Otra característica especial de las lipasas es que presentan una mayor proporción de zonas exteriores hidrófobas que el resto de enzimas, especialmente polarizadas, como cabría esperar, hacia la zona donde se encuentra su centro catalítico, de forma que cuando la lipasa se encuentra en su configuración cerrada se reduce la superficie lipófila disponible [102,134].

El uso de lipasas en medios no acuosos se ha incrementado de forma contundente desde mediados de los años ochenta, ya que las lipasas son más estables y activas que el resto de enzimas en este tipo sistemas. Aunque la utilización de medios orgánicos permite solubilizar mejor algunos compuestos, así como recuperar fácilmente los productos, la presencia de agua en dichos medios de reacción es un aspecto a considerar cuando se trabaja con lipasas, ya que ésta puede tener un doble efecto. Por una parte, se ha demostrado que, como todas las enzimas, requieren de una cantidad mínima de agua en su microentorno para garantizar una ionización y flexibilidad estructural de la proteína adecuadas para mantener su actividad catalítica, mientras que cantidades elevadas de agua facilitan su proceso de desactivación térmica y pueden obstaculizar la difusión del sustrato a la fase orgánica. Asimismo, en reacciones de esterificación y transesterificación, el agua desplaza el equilibrio de reacción en un sentido desfavorable, y puede llegar a provocar fenómenos de inhibición competitiva al ocupar los centros activos de la enzima en lugar de los sustratos. De este modo, se ha observado que la actividad enzimática es mayor en disolventes orgánicos no polares, ya que éstos tienen una menor capacidad de desproveer a la enzima del pequeño volumen de agua que la rodea, esencial para su funcionamiento [138,139].

Existe una amplia variedad de lipasas en la naturaleza, ya que animales, plantas, hongos, levaduras, bacterias y humanos las producen. Actualmente, es posible encontrar un considerable número de lipasas de forma comercial, siendo la mayoría de origen microbiano. Esto es debido a que su crecimiento es rápido y es posible utilizar medios de cultivo

económicos sin que se produzcan fluctuaciones estacionales. Además, los microorganismos a menudo son fáciles de manipular genéticamente, lo que permite introducir genes de cepas difícilmente cultivables o de las que no es posible su cultivo [140].

A continuación se van a describir en más detalle las enzimas seleccionadas para la realización de esta Tesis Doctoral.

• Lipasa B de Candida antarctica (CalB)

La *Candida antarctica* es una de las 154 cepas de la levadura *Candida* sp., y como su propio nombre indica, fue aislada en la Antártida [141]. *Candida antarctica* es capaz de sintetizar dos formas isoenzimáticas de la lipasa, muy diferentes entre ellas y con propiedades inusuales. De este modo, mientras que la lipasa tipo A es muy termoestable (presenta una temperatura óptima de 90 °C) y a efectos prácticos no específica, el tipo B es una enzima robusta que posee una alta regio y enantioespecificidad, tanto para la hidrólisis como para la síntesis, lo que hace que tenga un gran potencial para su uso a escala industrial y que existan numerosos estudios sobre ella [142].

La isoenzima B de *Candida antarctica* está compuesta por 317 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 33 kDa. Es una proteína globular de unos 30x40x50 Å de dimensión y presenta un punto isoeléctrico de 6. Aunque su pH óptimo para la catálisis es 7, es estable en un rango de pH de 3.5 a 9.5 cuando se halla en medio acuoso. Según el valor de dicho parámetro, su temperatura de desnaturalización varía entre 50 y 60 °C, aunque su resistencia operacional se incrementa de forma drástica al inmovilizarla [143,144].

Como se ha mencionado previamente, la actividad de CalB no se ve afectada por el fenómeno de activación interfacial, aunque posee la triada catalítica típica de las lipasas, formada por los residuos Ser105-His224-Asp187, que apenas está cubierta por una pequeña secuencia α -helicoidal, que va de los aminoácidos 142 a 146. Gracias a la cristalografía de rayos X se sabe que el centro activo de la CalB está compuesto de dos canales estrechos, siendo más grande el que alberga el grupo acilo, lo que condiciona su selectividad hacia los distintos compuestos [144,145]. Así, aunque no suele aceptar moléculas voluminosas, esta lipasa muestra preferencia ante sustratos provenientes de ácidos grasos de cadena larga, de modo que sólo actúa sobre alcoholes primarios y lineales mayoritariamente [144,146].

• Lipasa de *Rhizomucor miehei* (Rml)

Esta lipasa es una proteína extracelular del hongo *Rhizomucor miehei*, su peso molecular es de 31.6 kDa y su punto isoeléctrico de 3.8. Está constituida por una sola cadena de 269 residuos peptídicos, que se pliega para formar un único dominio de láminas β , que tiene la particularidad de ser asimétrico debido a que todos los bucles que las conectan van hacia la derecha y se localizan en un solo lado de las láminas.

El centro activo de esta lipasa es más ancho que largo, por lo que acepta como sustratos ácidos de cadena larga y una variedad más amplia de alcoholes que CalB. La triada catalítica de la Rml se compone de Ser144-His257-Asp203 y está cubierta por una pequeña hélice α anfipática, cuyos aminoácidos van del 85 al 91. La lipasa de *Rhizomucor miehei* sí presenta

activación interfacial y tiende a formar agregados bimoleculares de actividad reducida cuando se encuentra en su configuración abierta, por lo que en algunas situaciones es recomendable utilizar detergentes como el Tween para activar la enzima en medios orgánicos, o el Triton X-100 para mejorar su inmovilización.

Diversos estudios han constatado que Rml es especialmente estable cuando la actividad del agua es baja, y que una presurización del medio de reacción ayuda a evitar su desactivación térmica, lo que podría hacerla una enzima muy interesante para trabajar con fluidos supercríticos [135,146–148].

• Lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Tll)

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es otra enzima de origen fúngico, previamente conocida como *Humicola lanuginosa*. Tll tiene una forma más o menos esférica con unas dimensiones de 35x45x50 Å, su peso molecular es de 31.7 kDa y su punto isoeléctrico 4.4, aunque su pH óptimo de trabajo es 9. Además, es una lipasa muy estable que en su forma libre mantiene su actividad a temperaturas de entre 55 y 60 °C.

Al igual que la Rml, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* está constituida por una única cadena de 269 aminoácidos, aunque su plegamiento consiste en ocho cadenas centrales, predominantemente láminas β , interconectadas por cinco segmentos α -helicoidales. El centro catalítico de Tll está formado por los aminoácidos Ser146-His258-Asp201, y tiene mayor espacio para albergar alcoholes que ácidos. La fracción de hélice α que lo cubre va de los residuos 86 a 93 y está dotada de una gran movilidad, lo que contribuye a la activación interfacial de Tll y a que también forme dímeros con mucha facilidad [134,146,149].

2.3.3. Uso industrial de las lipasas.

La elección del tipo de ruta catalítica a implantar durante el diseño de un proceso industrial es de suma importancia, puesto que del tipo de catalizador seleccionado dependerá no sólo la velocidad y el rendimiento de reacción, sino también las necesidades de acondicionamiento de las materias primas, de purificación de los productos o el ahorro energético, entre otros.

A pesar de que la implantación a gran escala de los procesos biocatalíticos siempre se encuentra supeditada a la necesidad de que éstos sean económicamente rentables, la gran regio y enantioselectividad de las lipasas, el amplio rango de sustratos y de reacciones que son capaces de catalizar en medios orgánicos sin requerir cofactores y su disponibilidad comercial han hecho de éstas unas enzimas con gran éxito en la biotecnología industrial. En este apartado se exponen las principales aplicaciones, implantadas o potenciales, que han encontrado las lipasas en los diversos sectores industriales.

2.3.3.1. Eliminación de grasas y aceites.

• Producción de detergentes.

Una de las aplicaciones comerciales más importante para las lipasas es como aditivo en la fabricación de detergentes para lavadoras y lavavajillas, tanto industriales como domésticos, puesto que gracias a su actividad lipolítica, mejoran la detergencia de estos productos y evitan problemas de incrustación en los electrodomésticos [140,150].

Las lipasas empleadas con este fin suelen ser *Thermomyces lanuginosus, Aspergillus oryzae* o del género *Pseudomonas, Candida* y *Chromobacterium*. Dichas enzimas deben ser capaces de hidrolizar grasas con distintas composiciones bajo condiciones de operación severas, como un pH alcalino de entre 10 y 11 y temperaturas de lavado que pueden variar entre los 30 y 80 °C. Además, han ser resistentes a la acción de jabones, compuestos oxidantes, sustancias para combatir la dureza del agua, como el tripolifosfato de sodio o el carbonato de sodio, y surfactantes como el sulfonato de alquilbenceno lineal, un tensioactivo biodegradable ampliamente utilizado en la fabricación de detergentes y productos de limpieza [151–153].

Muchos detergentes contienen también amilasas, celulasas y proteasas, por lo que además, las lipasas deben poder resistir la acción proteolítica de estas últimas. A pesar de ello, la incorporación de uno o varios tipos de enzimas en la formulación del producto supone un gran beneficio desde un punto de vista medioambiental, ya que son biodegradables, no suponen un riesgo para la vida acuática y su uso conlleva una disminución de la temperatura de lavado y del contenido de productos químicos del detergente [150].

• Industria textil y del cuero.

Aunque la industria textil hace un mayor uso de enzimas como la catalasa o la arilesterasa, las lipasas son empleadas en este sector para conseguir que las prendas tengan una mayor absorbencia, de forma que su teñido sea más fácil y homogéneo. También se utilizan para evitar que las telas vaqueras se agrieten durante el proceso de abrasión que les da una apariencia desgastada, y junto con las α amilasas, para evitar que encojan [140]. Recientemente, se ha propuesto el empleo de lipasas y otras enzimas combinadas con ácido peracético para el blanqueo de tejidos de algodón y poliamida [154].

La piel animal contiene pelo, proteínas y grasas indeseables para el curtido del cuero, que convencionalmente se eliminan mediante un tratamiento mecánico en un tambor con agua, tensioactivos e hidróxido sódico, seguido de la digestión del pelo por acción de sulfuros. Dichos procesos pueden durar de varias horas a días, por lo que actualmente se suelen emplear proteasas y lipasas para reducir el tiempo de tratamiento, la energía y el volumen de químicos requeridos. Además, el empleo de lipasas permite obtener un cuero de color más uniforme y con aspecto más limpio, así como facilitar la producción de cuero impermeable [113,140].

• Industria papelera.

Cada año se requieren volúmenes ingentes de biomasa lignocelulósica procedente de la madera o de material reciclado para la producción de pasta de celulosa y papel. El procesado clásico de estos materiales se basa en una combinación de sistemas químicos y mecánicos que consumen grandes cantidades de materias primas y energía, lo que añadido a la deforestación, hace que esta industria sea considerada de las más agresivas con el medio ambiente. No obstante, la demanda social de productos libres de cloro y más sostenibles ha hecho que el desarrollo de enzimas para este sector esté en pleno crecimiento. Así pues, actualmente se emplean celulasas para el procesado termomecánico de la pulpa de madera o lacasas y xilanasas durante el proceso de blanqueo, entre otras.

Las lipasas se utilizan de forma rutinaria desde principios de los 90 en el control del alquitrán que se acumula durante el procesado mecánico de la pulpa, ya que éste disminuye la calidad del papel y obstaculiza el funcionamiento de la maquinaria. Asimismo, se pueden utilizar como asistentes de las celulasas en los sistemas para eliminar la tinta del papel reciclado [113,155,156].

2.3.3.2. Producción de biocombustibles.

Por lo general, el biodiesel se produce mediante transesterificación de triglicéridos de origen vegetal con metanol o etanol, a alta temperatura y en presencia de un catalizador alcalino (NaOH), de forma que se dan reacciones de saponificación y el medio debe ser neutralizado tras la síntesis. En estos últimos años, las lipasas han despertado un enorme interés como catalizadores de este proceso, ya que a diferencia del enfoque tradicional, la síntesis biocatalítica se lleva a cabo a baja temperatura, puede utilizarse aceite usado como materia prima, no se dan reacciones secundarias y permite una separación más sencilla del glicerol generado [157].

Existe por lo tanto un gran número de publicaciones al respecto, en las que se obtiene biodiesel a partir de aceites de orígenes diversos tanto en disolventes orgánicos como en sistemas libres de disolventes. Aunque se han empleado diversas lipasas con éxito, quizás las más utilizadas de entre las comerciales (libres o inmovilizadas) para la producción de biocombustibles sean las de *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacea*, *Thermomyces lanuginosus* o *Pseudomonas fluorescens* [158,159].

2.3.3.3. Síntesis de polímeros.

La creciente demanda de polímeros más avanzados y con nuevas funcionalidades, ha impulsado el desarrollo de rutas biocatalíticas alternativas a los procesos de polimerización convencionales. Las enzimas permiten combinar condiciones de reacción suaves con una alta selectividad y eficiencia, de forma que resulta más fácil controlar la estructura del polímero. Además, permiten la obtención de productos que no podrían sintetizarse mediante el uso de procesos químicos tradicionales por la inestabilidad de algunos monómeros a temperaturas elevadas [160,161].

De este modo, se ha descrito mediante el uso de lipasa B de *Candida antarctica* la obtención de poliamidas como el nylon [162] y de poliésteres, tanto por polimerización por apertura de anillo [163] como por condensación [164]. Asimismo, la síntesis de estólidos mediante lipasas de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* y *Thermomyces lanuginosus* ha sido estudiada por diversos autores [165,166].

2.3.3.4. Gestión de residuos y tratamiento de efluentes industriales.

Durante los procesos de digestión aeróbica de residuos sucede con frecuencia la formación de finas capas de lípidos en la superficie de los tanques aireados, que deben ser retiradas continuamente para poder permitir el transporte de oxígeno y mantener vivos los microorganismos responsables de la degradación de los desechos. Esta película rica en grasa puede eliminarse a través de la acción de lipasas, como la de *Candida rugosa*, por lo que estas enzimas no sólo pueden emplearse durante la gestión de residuos sólidos y aguas residuales, sino también en la limpieza de las capas de grasa adheridas en fosas sépticas o tanques de almacenamiento.

Las lipasas también pueden resultar de interés para el pretratamiento de los efluentes ricos en lípidos provenientes de mataderos, tenerías, de la industria alimentaria o de la restauración, ya que éstas permitirían reducir el tamaño de las partículas de grasa e incrementar su área superficial, de forma que sean más facilimente asimilables por los microorganismos utilizados en las depuradoras. Lipasas de origen pancreático y procedentes de *Pseudomonas aeruginosa* o *Yarrowia lipolytica* han sido estudiadas a este efecto [140,167].

2.3.3.5. Industria alimentaria.

El impacto ambiental causado por el sector alimentario es enorme, ya que cada año requiere de grandes cantidades de energía, agua y materias primas provenientes de la agricultura y la ganadería para elaborar sus productos.

• Procesado de grasas alimentarias.

Actualmente, la transformación de grasas y aceites para obtener triglicéridos con mejores características fisicoquímicas es un área de gran interés en la industria alimentaria. Por ejemplo, la modificación de las propiedades de fusión de los lípidos es clave para la producción de grasas para hornear y margarina, a las que con este fin se le añaden aceites hidrogenados. Así, frente a la vía convencional que obtiene aceites con propiedades indeseables para la industria alimentaria y que han de ser reprocesados, dichas grasas hidrogenadas pueden conseguirse mediante un proceso de interesterificación específico catalizado por lipasas, mayoritariamente de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada [168]. Asimismo, los aceites de baja calidad se pueden convertir mediante lipasas en productos con mejores propiedades nutricionales, como los sustitutos de la manteca de cacao o los aceites enriquecidos en ácido oleico [140].

• Aditivos alimentarios.

Los procesos de esterificación catalizados por lipasas resultan también tremendamente interesantes en la obtención de aditivos alimentarios ya que permiten mejorar sus propiedades organolépticas, como es el caso de emulsionantes como del polirricinoleato de poliglicerol o de los ésteres de azúcares [169,170]. Además, son admitidos para poder conseguir el etiquetado "natural", por lo que, como ocurre en la producción de aromas y sabores frutales, la síntesis biocatalítica resultar ser una alternativa ventajosa a los costosos procedimientos de extracción directa de la fuente natural [171].

• Sector lácteo.

Entre las aplicaciones actuales de las lipasas se incluye la mejora del sabor y la aceleración de la maduración de los quesos o la lipólisis de la mantequilla y las cremas lácteas. Esto se debe a que las lipasas son buenos catalizadores de la hidrólisis de la grasa de la leche, que da lugar a la liberación de ácidos grasos que dotan a muchos productos lácteos de su sabor característico y que participan en las reacciones químicas sencillas llevadas a cabo por la población microbiana del queso [140]. Las lipasas tradicionalmente destinadas a la hidrólisis de las grasas de la leche son las de páncreas bovino y porcino, aunque también se pueden usar lipasas de origen microbiano, como la de *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti* o *Rhizomucor javanicus* entre otras [159].

Las lipasas también juegan un papel crucial en la preparación de los denominados quesos modificados enzimáticamente, quesos que se incuban en presencia de enzimas a temperatura elevada con el fin de producir un sabor concentrado que se incorporará a otros productos como salsas, aderezos, sopas, aperitivos, etc. [140].

• Panadería.

A diferencia de la industria de los lácteos, las propiedades hidrolíticas de las lipasas son apreciadas en panadería no por la liberación de ácidos grasos, sino de glicerol, ya que éste confiere a las levaduras una mayor tolerancia a la congelación. Asimismo, la acción de las lipasas hace que se liberen sustancias que forman complejos lípido-proteína que incrementan la capacidad de retención del agua de la masa del pan, lo que mejora sus propiedades reológicas [172]. Las lipasas pueden reemplazar parcial o totalmente los emulsificantes empleados en la panadería, ayudar a aumentar el volumen en panes y, combinadas con amilasas, evitar la cristalización del almidón del pan, principal responsable de que se endurezca. Así, las lipasas más empleadas en este sector son las de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Candida cylindracea* [113,140].

2.3.3.6. Elaboración de productos farmacéuticos intermedios.

Las enzimas presentan una amplia serie de ventajas en la síntesis de intermedios para el sector farmacéutico, como son su versatilidad o la facilidad para separar los productos entre otras, aunque probablemente sea su alta selectividad la cualidad más valorada en la industria farmacéutica ya que alrededor del 70% de las sustancias con fines terapéuticos son compuestos quirales [173]. La regio y enantioselectividad es especialmente importante en la síntesis de moléculas bioactivas, ya que sólo una de las formas enantioméricas manifiesta bioactividad, pudiendo llegar a ser tóxica la otra. Además, la elevada especificidad requerida para algunas reacciones llevadas a cabo en este sector hace que sólo sean viables a través de rutas enzimáticas, por lo que el coste de las enzimas no es un factor limitante para productos con tan alto valor añadido.

La reacción de aminación regioselectiva catalizada por *Pseudomonas cepacia* para obtener un derivado con valina del fármaco para el tratamiento del herpes Lubocavir [174], la obtención de (S)-ibuprofeno por resolución cinética de una hidrólisis realizada con *Candida rugosa* [175] o la síntesis chemoenzimática de la prometazina, un antihistamínico, utilizando lipasa B de *Candida antarctica* [173] son un pequeño ejemplo del gran potencial de las lipasas en la industria farmacéutica.

2.3.3.7. Obtención de ingredientes cosméticos.

La contribución de las lipasas en la ruptura de los pequeños depósitos de grasa acumulados en el cuerpo, en la eliminación de la piel muerta y de la suciedad corporal hace de estas enzimas sustancias atractivas para el sector de la cosmética, ya que pueden ser incluidas en productos para la limpieza de la piel o para el tratamiento anticelulítico. Sin embargo, aunque se pueden encontrar como ingredientes de formulaciones, la mayor aplicación de las lipasas en la industria cosmética es como biocatalizadores [176].

Un ejemplo de ello es la síntesis de ésteres de ácidos grasos con fines emulsionantes, detergentes, espesantes y principalmente emolientes. Por lo general, dichos compuestos se obtienen a través de la esterificación directa de un ácido y un alcohol de cadena larga, o de la transesterificación de una grasa o aceite con un alcohol. Una de las rutas sintéticas más extendidas hasta ahora es la que se basa en el uso de oxalato de estaño (II) a 240 °C como biocatalizador. Dado que este tipo de catálisis no es selectiva y requiere una temperatura muy elevada, en el medio de reacción suelen producirse reacciones secundarias de polimerización, reordenamiento y oxidación, especialmente cuando alguno de los sustratos contiene un doble enlace o más grupos hidroxilo y carboxilo de los que deberían participar en la reacción. De este modo, el éster sintetizado suele ir acompañado de una serie de productos indeseables, de forma que el proceso debe ser completado por una serie de etapas de post tratamiento para que el producto final presente una calidad adecuada en cuanto a olor, color y pureza [177,178]. Otros autores han descrito procedimientos en los que se plantean problemas similares al anterior, ya que requieren temperaturas superiores a los 160 °C y el uso de sustancias alcalinas, ácidos fuertes o metales como catalizadores de la reacción, de forma que procedimientos de post tratamiento deben incluir una etapa de neutralización tras la síntesis,

una desodorización con vapor y un blanqueo con clorito de sodio o peróxido de hidrógeno. Dichas etapas de reprocesado, no sólo pueden llevar a la pérdida de parte del éster deseado, sino que a veces no resultan completamente efectivas y el producto final presenta un olor remanente e impurezas añadidas provocadas por los agentes químicos utilizados. A estos inconvenientes hay que sumar la gran cantidad de residuos generados, que a veces resultan difíciles de gestionar por la presencia de restos de biocatalizador [179,180].

En contraposición a la vía sintética tradicional, la biocatálisis presenta una serie de atributos técnicos y medioambientales muy atractivos, como son el empleo de condiciones de reacción moderadas y la elevada selectividad de la enzima. En este sentido, se ha descrito la síntesis de ésteres emolientes utilizando lipasas inmovilizadas (principalmente lipasa B de *Candida antarctica*) mediante el uso de reactores de lecho fijo. Estos reactores suelen emplearse junto con tanques en los que se hace vacío para eliminar el agua o el alcohol liberados durante el proceso de esterificación o transesterificación, respectivamente, de forma que se desplace el sentido de la reacción a favor de la síntesis. En dichos sistemas combinados, la mezcla de reacción se encuentra a 60 °C y está compuesta sólo por los sustratos en las proporciones adecuadas, puesto que no hay necesidad de utilizar disolventes orgánicos que harían de los productos sustancias poco idóneas para su uso cosmético. Así pues, los reactantes se recirculan por el reactor para obtener productos de elevada pureza y calidad en cuanto a olor y color, por lo que no han de ser sometidos a ningún post tratamiento (Figura 2.14) [178,180].

La catálisis mediante lipasas supone por lo tanto una solución a los problemas planteados durante la síntesis química. El hecho de no tener que reprocesar el producto, no sólo conlleva un ahorro del tiempo de operación, sino también un menor volumen de residuos que gestionar. Además, la reducción del sobrecoste derivado del post tratamiento en energía, agua, productos químicos e infraestructura, redunda en un considerable ahorro económico, que puede compensar en muchas ocasiones la inversión relativamente elevada en biocatalizador típica de estos procesos.



Figura 2.14- Comparación entre los procesos de síntesis de ésteres emolientes por vía enzimática y por catálisis clásica [177].



3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos.

3.1. Materiales.

3.1.1. Reactivos y biocatalizadores.

3.1.1.1. Sustratos.

Los sustratos utilizados en la síntesis de los cuatro ésteres que componen el espermaceti biotecnológico, son los siguientes:

- Alcohol cetílico con calidad analítica, suministrado por Fluka.
- Ácido láurico con un 99% de pureza, de Acros Organics.
- Ácido mirístico con un 98% de pureza, de Fluka.
- Ácido palmítico con un 98% de pureza, de Fluka.
- Ácido esteárico con un 95% de pureza, de Fluka.

3.1.1.2. Biocatalizadores.

Durante desarrollo de esta Tesis Doctoral se han comparado nueve biocatalizadores (en Anexo I se pueden consultar sus fichas técnicas), de los cuales cuatro están puestos a la venta ya inmovilizados por la propia casa comercial.

Tabla 3.1- F	rincipales características	de los biocatalizac	lores comercial	es.			
Biocatalizador	Matriz	Tipo	Área superficial (m²/g)	Diámetro de poro (Å)	Diámetro de partícula (µm)	Enzima inmovilizada (% en peso)	Actividad enzimática
Novozym® 435	metacrilato (Lewatit [®] VP OC 1600)	moderadamente hidrofóbico	110 - 150	140 - 170	1	15 - 25	>10000 PLU/g ^a
Lipozyme [®] RM IM	fenol/formaldehído (Duolite ES 562)	intercambio aniónico débil	126.4	190	600	5 - 15	275 IUN/g ^b
Lipozyme [®] TL IM	silicato catiónico	intercambio aniónico	1	ł	300 - 1000	5 - 15	250 IUN/g ^b
CalB immo Plus	poliestireno/metacrilato (Purolite [®] Lifetech TM ECR 1030 M)	hidrofóbico	>90	200 - 300	300 - 710	1	>9000 PLU/g ^a
^a PLU/g: uni ^b IUN/g: uni	idades de laurato de propile dades de interesterificación						

En la Tabla 3.1 se comparan las principales características técnicas de los biocatalizadores comerciales seleccionados, que son los siguientes:

- Novozym[®] 435, un biocatalizador de lipasa B de *Candida antarctica* donado generosamente por Novozymes A/S.
- Lipozyme[®] RM IM, elaborado por inmovilización de la lipasa de *Rhizomucor miehei* y donado generosamente por Novozymes A/S.
- Lipozyme[®] TL IM, biocatalizador obtenido por inmovilización de lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, donado generosamente por Novozymes A/S.
- CalB immo Plus, un derivado inmovilizado de lipasa B de *Candida antarctica* desarrollado por Purolite Ltd. y c-LEcta GmbH.

Los cinco biocatalizadores restantes han sido elaborados en el laboratorio mediante la inmovilización sobre soportes poliméricos de una disolución de lipasa B de *Candida antarctica* cuyo nombre comercial es Lipozyme[®] CALB L. Este producto también ha sido donado generosamente por Novozymes A/S, que la produce por fermentación sumergida del hongo *Aspergillus niger*, modificado genéticamente para que exprese el gen que codifica la lipasa B de *Candida antarctica*. Lipozyme[®] CALB L es un líquido de color amarillo a marrón claro dependiendo del lote, con una densidad aproximada de 1.20 g/mL y que presenta una actividad mínima de 5000 LU/g (determinada mediante hidrólisis de tributirina) si es conservado en las condiciones adecuadas [181]. En la Tabla 3.2 se muestra la composición de éste preparado enzimático.

Compuesto	Cantidad (%)
Sólidos enzimáticos	4
Glicerol	25
Sorbitol	25
Agua	46
Benzoato de sodio	0.2
Sorbato de potasio	0.1

Tabla 3.2- Composición de Lipozyme[®] CALB L [181].

Tabla 3.3- Princip	ales características de los soj	portes para inmov	vilización.			
Soporte	Matriz	Tipo	Área superficial (m²/g)	Diámetro de poro (Å)	Diámetro de partícula (µm)	Humedad del soporte (%)
Lewatit [®] VP OC 1064 MD PH	poliestireno entrecruzado	hidrofóbico	008	50 - 100	440 - 540	50 - 60
Amberlite ^{тм} ХАD ^{тм} 1180	poliestireno/DVB	hidrofóbico	≥450	300 – 400	350 - 600	61 - 67
Purolite [®] Lifetech TM ECR 1090 M	poliestireno/DVB	hidrofóbico	>750	900 - 1100	300 - 710	67 - 73
Purolite [®] Lifetech TM ECR 8806 M	metacrilato de octadecilo	hidrofóbico	>80	500 - 700	300 - 710	58 - 63
Purolite [®] Lifetech TM ECR 8285 M	epoxi/butil metacrilato	resina epóxida	1	400 - 700	100 - 710	70 - 80

3.1.1.3. Soportes para la inmovilización.

Las resinas utilizadas como soporte para la inmovilización de Lipozyme[®] CALB L son:

- Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH, desarrollado por Lanxess AG y adquirido en Fluka.
- Amberlite[™] XAD[™] 1180, producto de Rohm and Haas suministrada por Fisher Scientific.
- Purolite[®] Lifetech[™] ECR 1090 M, resina elaborada y adquirida en Purolite Ltd.
- Purolite[®] Lifetech[™] ECR 8806 M, fabricada y suministrada por Purolite Ltd.
- Purolite[®] LifetechTM ECR 8285 M, también de Purolite Ltd.

En la Tabla 3.3 se recogen las principales propiedades de dichos soportes, cuyas fichas técnicas se recogen en el Anexo I.

3.1.1.4. Reactivos para la inmovilización de la lipasa.

A continuación se enumeran los reactivos utilizados para inmovilizar Lipozyme[®] CALB L, ya sea por adsorción o por enlace covalente:

- Etanol absoluto (99.5%), de Panreac.
- Tampón fosfato 0.1 M y 1 M, ambos con un pH igual a 7 y elaborados a partir de fosfato bisódico (≥99.0%), de Panreac, y de fosfato monosódico (≥99.0%), comercializado por Fluka.
- Disolución de tampón fosfato 0.1 M y pH 7 que contiene cloruro sódico (≥99.0%), suministrado por Panreac, en una concentración de 0.5 M.

3.1.1.5. Reactivos para el análisis de proteínas.

Para el análisis del contenido de proteína realizado durante las inmovilizaciones, se ha requerido el uso de diversas disoluciones elaboradas a partir de:

- Tartrato sódico-potásico con calidad analítica, de Probus.
- Carbonato sódico (99.0%), de Fluka.
- Hidróxido sódico (97.0%), suministrado por TQCHEM.
- Sulfato cúprico pentahidratado con calidad analítica, de Merck.
- Reactivo de Folin-Cicalteau, de Sigma.
- Albúmina de suero bovino (≥98.0%), suministrada por la casa comercial Sigma.

3.1.1.6. Reactivos para el seguimiento de la esterificación y la caracterización química del producto de reacción.

La determinación del grado de avance de la reacción y de las principales características del producto se ha llevado a cabo utilizando los siguientes reactivos:

- Hidróxido potásico (≥85.0%), de Sigma-Aldrich.
- Fenoltaleína químicamente pura, de Panreac.
- Éter dietílico (>99.0%), suministrado por Fisher Chemical.
- Etanol absoluto (99.5%), de Panreac.
- Hidrógenoftalato de potasio, patrón primario, suministrado por Acros Organics.
- Piridina (≥99.9%), de Sigma-Aldrich.
- Anhídrido acético químicamente puro, de la casa comercial Rectapur.
- Ácido clorhídrico (37%), suministrado por Panreac.
- Disolución de Wijs 0.1 M, de Fluka.
- Yoduro potásico (≥99.0%), de TQCHEM.
- Tiosulfato sódico pentahidratado con calidad analítica, de Merck.
- Carbonato sódico anhídrido (≥99.0%), de Fluka.
- Cloroformo con calidad analítica, de Merck.
- Dicromato potásico puro, patrón primario de Sigma.
- Almidón de trigo, de Fluka.
- Hydranal[®] para la valoración de Karl Fischer por el método coulombimétrico, de Fluka.
- Hexano con calidad analítica, de Fisher Chemical.
- Tetrahidrofurano (≥99.99%) para cromatografía en fase líquida, de Fisher Chemical.
- Acetona (≥99.99%) para cromatografía en fase líquida, de Acros Organics.
- Acetonitrilo (≥99.9%) para cromatografía en fase líquida, de Sigma-Aldrich.

3.1.1.7. Ingredientes para la formulación de una crema cosmética estándar.

A continuación se enumeran las sustancias utilizadas para la elaboración de una emulsión cosmética típica, que contenga los ésteres sintetizados por vía enzimática durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. En primer lugar se citará el nombre comercial del ingrediente así como su fabricante. Tras ellos, si es necesario, se describirá la composición del producto en la nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (nombres INCI).

- DUB 340, de la casa comercial Stéarinerie Dubois: cetyl alcohol, glyceryl stearate, PEG-75 stearate, ceteth-20, steareth-20.
- DUB 810C, de Stéarinerie Dubois: coco caprylate/caprate.
- Arlamol HD, de Croda: isohexadecane.
- Ésteres cetílicos y espermaceti biotecnológicos.
- Ésteres comerciales: laurato de cetilo de Croda y palmitato de cetilo de Prod'hyg.
- Glicerina, suministrada por Aroma-Zone.
- Ultrez 10, de Lubrizol: carbomer.
- Isocide SMM, de Biophil: propylene glicol, methylpropanediol, postassium sorbate, methylisothiazolinone.
- Disolución de hidróxido sódico al 10%.

3.1.2. Equipos.

3.1.2.1. Sistema para la inmovilización de enzimas.

Para llevar a cabo la inmovilización de Lipozyme[®] CALB L sobre las resinas reseñadas en el Apartado 3.1.1.3, se han utilizado los equipos descritos a continuación (Figura 3.1):

- Agitador orbital con incubadora, de Infors HT.
- Reactores tubulares de vidrio, fabricados por Afora (diseño propio).

Dichos reactores son encamisados y tienen 30 cm de longitud, 2.5 cm de diámetro y una placa de vidrio sinterizado a 5 cm del fondo.

• Criostato, de Thermo Electron Corporation.

Equipo de refrigeración compuesto por el controlador de temperatura Haake DC30 y el baño Haake K20.

- Bombas peristálticas modelo 505 Du, de Watson Marlow.
- Sistema de filtrado a vacío.

Está compuesto por un matraz colector de Afora así como de un embudo y una base sinterizada con conexión para sistema de vacío, ambos de vidrio de borosilicato y fabricados por Merck Millipore. Se utilizaron además filtros acuosos de Gelman Sciences, con 0.45 μ m de poro y 47 mm de diámetro.



Figura 3.1- Fotografía del equipo utilizado para la inmovilización.

3.1.2.2. Equipos para la síntesis a presión atmosférica.

Las reacciones de esterificación a presión atmosférica se han realizado utilizando el siguiente equipamiento (Figura 3.2):

• Reactores tanque de vidrio, de Afora.

Los reactores están abiertos a la atmósfera, son encamisados y tienen una capacidad de 250 mL.

• Agitadores verticales modelo RW 11 Basic, de IKA[®].

Su rotor está constituido por dos alas fijas de tipo hélice no intercambiables. Permite regular la velocidad de giro.

• Termostato de inmersión DIGITERM-100, de JP Selecta.

Proporciona una temperatura máxima de 100 ± 0.05 °C.



Figura 3.2- Fotografía de tres reactores abiertos a la atmósfera conectados en serie.

3.1.2.3. Equipo para la experimentación a presión reducida.

La mayoría de los ensayos de síntesis de los ésteres cetílicos y del espermaceti se ha llevado a cabo en un equipo constituido por los siguientes elementos:

• Reactor tanque de altas prestaciones modelo 5101 (Parr 5100 series), de Parr Instruments Co.

Su recipiente de vidrio encamisado de 100 mL de capacidad permite trabajar a una presión de hasta 10 atm y una temperatura de 225 °C. El cabezal del reactor está constituido por los siguientes elementos:

- Motor de agitación de transmisión magnética tipo A1120HC (1/8 HP) de alto par, con eje y turbina, que permite velocidades de agitación de hasta 1750 rpm. Está diseñado para proporcionar una buena mezcla axial y hasta 2000 horas de servicio sin parada.
- Agitador de cuatro palas planas inclinadas modelo A1120HC9, de Parr Instruments Co.
- Controlador de temperatura y velocidad de agitación PID con rampas y segmentos, modelo 4875.
- Tacómetro digital (TDM).
- Anillo de cierre del reactor dividido en dos mitades con tres tornillos cada una, que garantiza la hermeticidad y seguridad del sistema.
- Manómetro con escala doble de Ashcroft, de modo que mide hasta -30" Hg y 300 psi.
- Vacuómetro para medir con mayor precisión las presiones inferiores a la atmosférica, cuya escala llega a -76 cmHg.
- Sensor para la medida de la temperatura en el interior del tanque de reacción.
- Tubo de inmersión.
- Válvula solenoide para el control del líquido refrigerante (SVM).
- Válvula de purga.

- Válvula para la entrada de gas.
- Válvula para la toma de muestras líquidas.
- Disco de ruptura de seguridad tarado a 1000 psi.
- Válvula de seguridad ajustable entre 50 y 150 psi.

Todo el equipo está controlado por un ordenador personal con el software "SpecView", que a su vez está conectado al controlador de proceso 4871A, de Parr Instruments Co.

En la figura siguiente se puede observar el tanque de reacción acoplado al cabezal previamente descrito.



Figura 3.3- Fotografía del reactor de altas prestaciones 5101 de Parr Instruments Co.

• Generador de nitrógeno autónomo 3848 NitroFlow Lab, de Parker.

Este equipo permite la introducción de una atmósfera inerte en el medio de reacción. Se sirve de una combinación de compresor y tecnologías de membrana para poder llegar a producir hasta 32 L/min de nitrógeno puro con grado LC/MS a presiones de 8 bar. El rotámetro modelo 140-1355 EVD con tubo de vidrio de borosilicato R2-15-C y bola tipo Saphir, de la casa comercial Brooks, permite medir y controlar el caudal de nitrógeno que llega al reactor.

• Bomba de vacío KNF N816.3.KN18, de KNF.

El vacío en el tanque de reacción se consigue empleando esta bomba de membrana libre de aceite, que soporta temperaturas de entre 5 y 40 °C y una presión máxima de 0.5 bar. Debe

estar colocada en una zona elevada y protegerse de los líquidos generados por condensación de los gases provenientes del reactor.

• Baño termostático programable, de PolyScience.

Este equipo tiene un sistema de calefacción de 1000 W y proporciona temperaturas de hasta 200 ± 0.01 °C. Tiene una capacidad máxima de 6 L y un caudal de 7 a 15 L/min.

3.1.2.4. Equipos para la formulación de cremas cosméticas.

A continuación se describe los principales instrumentos requeridos para la preparación de las emulsiones cosméticas de aceite en agua.

• Mezclador de sobremesa Turbotest, de VMI Rayneri.

Equipado con un agitador desfloculador que proporciona un flujo radial, este mezclador programable permite velocidades de agitación comprendidas entre 50 y 3300 rpm y trabajar con un volumen de mezcla de 0.2 a 20 L (Figura 3.4).



Figura 3.4- Mezclador de sobremesa Turbotest.

• ULTRA-TURRAX[®] digital T 25, de IKA[®].

Este instrumento de alto rendimiento permite realizar dispersiones para volúmenes de 1 a 2000 mL. Consta de un indicador digital de velocidad, cuyo rango va de 3000 a 25000 rpm, lo que permite al usuario trabajar a velocidades circunferenciales elevadas incluso con diámetros de rotor pequeños. Dicho ULTRA-TURRAX[®] está equipado con un elemento de dispersión de acero inoxidable modelo S 25 N – 25 F, cuya geometría es tipo rotor-estator y permite velocidades máximas de 25000 rpm.

3.1.2.5. Otros equipos.

Durante la experimentación realizada para este trabajo, se ha requerido la utilización de otros equipos, descritos seguidamente.

• Espectrofotómetro UV/visible Evolution 300, de Thermo Scientific Corporation.

Para llevar a cabo determinación del contenido en proteínas de las muestras de las inmovilizaciones se utilizó este espectrofotómetro de ancho de banda espectral variable, cuya lámpara de xenón cubre longitudes de onda comprendidas en el intervalo del ultravioleta y el visible. Las cubetas usadas son de cuarzo, de 3 mL de capacidad y con una anchura de paso óptico de 1 cm. En la Figura 3.5 se puede observar dicho equipo.



Figura 3.5- Espectrofotómetro UV/visible Evolution 300.

• pH-metro GLP 21, de Crison.

Este modelo de sobremesa tiene una precisión de hasta 0.01 unidades de pH y permite medir por estabilidad, en continuo o por tiempo. Su electrodo tiene un rango de medida de pH de 0 a 14 para temperaturas de operación comprendidas entre -10 y 100 °C.

• Balanza de precisión CP224 S, de Sartorius.

Esta balanza tiene una precisión de 0.1 mg y admite un peso máximo de 220 g.

• Sistema de reflujo.

El instrumental de vidrio que lo compone consiste en una columna de refrigeración de siete burbujas o platos a la que se le puede acoplar en su parte inferior un matraz de bola, de 100 ó 250 mL según el ensayo realizado. Dicho matraz se calienta al baño maría mediante un agitador magnético/calefactor modelo AGIMATIC-N, de JP Selecta.

• Medidor de humedad Karl Fischer modelo 899, de Metrohm.

Este valorador de humedad por coulombimetría consta de un electrodo de generación sin diafragma y está especializado en muestras con muy bajo contenido en agua (10 μ g a 200 mg). Como se puede constatar en la Figura 3.6, está equipado con el horno 860 KF Thermoprep, de la misma casa comercial, que permite el análisis de muestras insolubles, susceptibles de reaccionar con el reactivo de Karl Fischer o que liberan agua lentamente o sólo a altas temperaturas. La muestra debe ser introducida en viales herméticamente cerrados antes de ser pretratada en el horno.



Figura 3.6- Valorador Karl Fischer coulombimétrico y horno de preparación de muestras 860 KF Thermoprep.

• Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), de Waters.

Este equipo modular está compuesto por los siguientes elementos, todos ellos de la misma casa comercial:

- Inyector automático modelo 717 plus, que permite la inyección automática de hasta 96 muestras con un volumen de inyección variable de 0.1 a 200 μL.
- Desgasificador en línea que funciona por vacío y está preparado para tratar cuatro eluyentes.
- Bomba cuaternaria con módulo controlador 600 E, que incluye un horno para termostatar la columna.
- Columna XBridgeTM C18, con un tamaño de partícula de 5 μ m y unas dimensiones de 4.6 x 150 mm.
- Detector de matriz de fotodiodos modelo 2996.

Además, se encuentra conectado a un ordenador personal con el software "Empower 2", que permite el control del sistema y el tratamiento de los datos cromatográficos.



En la Figura 3.7 se puede observar las distintas partes del HPLC previamente descritas.

Figura 3.7- Cromatógrafo líquido de alta resolución de la casa Waters.

• Calorímetro diferencial de barrido Pyris 1, de Perkin Elmer.

Este equipo (Figura 3.8) consta de un horno de dos celdas independientes para albergar las cápsulas de aluminio que contienen muestra y referencia. Con el fin de ampliar el rango de temperaturas abarcado, está dotado de un "intracooler" IIP, de forma que se pueda alcanzar una temperatura mínima de -129 °C de forma rápida. Mediante el software "Pyris" instalado en un ordenador de sobremesa, se puede elaborar un programa de calentamiento y enfriamiento de la muestra para determinar sus propiedades térmicas.



Figura 3.8- Calorímetro diferencial de barrido Pyris 1.

• Texturómetro TA.XT plus, de Stable Micro Systems.

El analizador de textura TA.XT plus permite realizar ensayos de compresión, adherencia, extrusión o flexión, entre otros, en muestras sólidas, semisólidas, viscosas, en polvo o granuladas. Esto se debe a que el equipo consta de diversos accesorios y sondas intercambiables, es capaz de ejercer fuerzas de hasta 500 N y desplazarse a velocidades de 0.01 a 40 mm/s con un recorrido vertical máximo de 370 mm.

Para estudiar la consistencia y firmeza de las emulsiones cosméticas se escogió utilizarlo con la sonda P/0.5R, un cilindro de plástico Delrin de $\frac{1}{2}$ " de diámetro, y acoplado a una cabina con sistema Peltier XT/PC para realizar los ensayos a temperatura controlada.

El equipo utilizado para evaluar la extensibilidad de las cremas está compuesto por el texturómetro TA.XT plus al que se le ensambla el módulo de fricción A/FR (ASTM-D 1894-90), cubierto por una hoja de polipropileno, y un móvil metálico de 63.5 x 63.5 mm y 200 ± 5 g, que se desplaza a lo largo del módulo de fricción de manera continua a la velocidad fijada gracias a un sistema de polea. En una de las caras del móvil se encuentra fija una placa de polimetilmetacrilato HelioplateTM HD 2 (fabricada por Helioscreen), de 50 x 50 mm, que proporciona una rugosidad homogénea sobre toda la superficie de 2 µm. En la Figura 3.9 se puede observar dicho dispositivo.

Además, el texturómetro trabaja asociado a un ordenador personal con el software "Exponent" para un mejor control de los parámetros de ensayo y una toma de datos continua.



Figura 3.9- Equipo para la determinación de la extensibilidad de una emulsión cosmética.

• Granulómetro SALD-7500nano, de Shimadzu.

Mediante la técnica de difracción láser, el granulómetro SALD-7500nano permite determinar un amplio rango de tamaños de partícula o gota (7 nm a 800 µm) incluso en muestras de concentración tan baja como 0.1 ppm. Esto se debe a que está equipado con un sensor frontal compuesto de 78 elementos, un sensor lateral y cinco sensores posteriores para poder hacer una captura precisa de la intensidad de luz dispersada por las partículas en cualquier dirección. El equipo está además conectado a un ordenador de sobremesa que contiene el software "WingSALD II", que permite tratar las dispersiones tanto en volumen como en número de partícula o gota. Las muestras se introducen en la celda de medida de cuarzo de 5 mL de capacidad SALD-BC75, en la que se dispone un pequeño agitador de forma que las partículas no sedimenten (Figura 3.10).



Figura 3.10- Detalle del equipo SALD-7500nano abierto con la cubeta SALD-BC75.

• Microscopio Leica DMLP, de Leica Microsystems AG.

Las formulaciones fueron observadas en este microscopio óptico, que permite tanto trabajar con luz polarizada como transmitida, siendo éste último el modo escogido. El microscopio está equipado con una cámara y conectado a un ordenador con el software "IM 1000", por lo que es posible tomar fotografías de las muestras y tratarlas con el fin de determinar la talla de los elementos observados.

3.2. Métodos.

3.2.1. Protocolos para la inmovilización de enzimas.

3.2.1.1. Inmovilización por adsorción.

Para realizar la adsorción física de la lipasa contenida en Lipozyme[®] CALB L sobre los soportes hidrófobos (Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH, AmberliteTM XADTM 1180, Purolite[®] LifetechTM ECR 1090 M y Purolite[®] LifetechTM ECR 8806 M), éstos deben ser previamente activados. Con este fin, se ha de poner en contacto 5 g de soporte con 50 mL de una disolución de etanol en agua al 10% (v/v) durante unas 12 h, a temperatura ambiente y en el agitador orbital a 120 rpm.

Tras el periodo de activación, el soporte se lava dos veces con 25 mL de agua y se transfiere al reactor tubular de Afora, retirando el agua del segundo lavado. A continuación se añaden 25 mL de una disolución al 50% (v/v) de Lipozyme[®] CALB L y tampón fosfato 0.1 M con pH igual a 7. Ésta se deja recircular durante 72 h a 4 °C utilizando el criostato y la bomba peristáltica (a 12 rpm) descritos en la Sección 3.1.2.1.

Pasados los tres días, se recoge el sobrenadante de la inmovilización y se lava el biocatalizador dos veces con el mismo tampón utilizado para diluir el preparado comercial de lipasa, aprovechando el segundo de ellos para extraer del reactor tubular el derivado inmovilizado. Estas tres fracciones han de guardarse por separado y refrigeradas para determinar posteriormente la cantidad de enzima adsorbida sobre el soporte.

Por último, se seca el biocatalizador al aire con ayuda del sistema de filtrado a vacío descrito en el Apartado 3.1.2.1. Las diferentes fracciones de biocatalizador obtenidas en cada una de las inmovilizaciones han de ser mezcladas de forma que se obtenga un biocatalizador con propiedades homogéneas, tras lo cual es almacenado a 7 °C hasta su uso.

3.2.1.2. Inmovilización por enlace covalente.

Con el fin de preparar la resina epóxida Purolite[®] Lifetech[™] ECR 8285 M para la inmovilización, sus propios fabricantes recomiendan que se lave con tampón fosfato de alta concentración antes de ponerla en contacto con la enzima. Así pues, en primer lugar se ha de lavar 5 g de soporte con 50 mL de tampón fosfato 1 M con pH igual a 7, utilizando para ello el agitador orbital a 120 rpm.

Una vez lavado, el soporte se trasvasa al reactor en columna descrito en el Apartado 3.1.2.1 y se retira el tampón de sobrenadante. Seguidamente se añaden 25 mL una disolución al 50% (v/v) de Lipozyme[®] CALB L en tampón fosfato 1 M con un pH igual a 7, que se hace recircular durante 72 h gracias a la bomba peristáltica a 12 rpm. A diferencia del

protocolo descrito para inmovilizar por adsorción, el sistema se mantiene refrigerado a una temperatura mayor, 9 °C, para evitar la precipitación del fosfato contenido en el tampón.

Tras el periodo de inmovilización, el sobrenadante es recuperado y el derivado inmovilizado se lava con tampón fosfato 0.1 M con pH 7. Con el fin de garantizar la desorción de la lipasa que no haya sido inmovilizada por enlace covalente, el biocatalizador es vuelto a lavar de nuevo con una disolución de tampón fosfato 0.1 M y pH igual a 7 que contiene cloruro sódico en una concentración de 0.5 M.

Por último, el preparado enzimático se seca al aire utilizando el sistema de filtrado a vacío, es mezclado con el resto de fracciones de las diversas inmovilizaciones, y almacenado a 7 °C hasta su uso.

3.2.2. Método de Lowry para el análisis de proteínas.

La determinación de la cantidad de enzima retenida sobre las resinas poliméricas descritas en el Apartado 3.1.1.3, así como el rendimiento del proceso de inmovilización, se llevó a cabo por diferencia entre la cantidad de proteína contenida en la disolución de Lipozyme[®] CALB L puesta a inmovilizar y la que existe tanto en el sobrenadante de la inmovilización, como en los dos lavados posteriores.

El análisis de la proteína contenida en dichas muestras, se ha llevado a cabo siguiendo el método de Lowry modificado por Hartree [182], como se describe a continuación.

A 1 mL de la disolución a la que se le va a determinar su concentración en proteína (pertinentemente diluida si fuera necesario) se le añade 0.9 mL de la disolución A, se agita y se introduce en un baño a 50 °C durante 10 min, tras los cuales se deja enfriar. Una vez a temperatura ambiente, se adiciona 0.1 mL de disolución B, se agita de nuevo y se deja reposar la muestra 10 min más sin calentar. Tras esto, se agregan 3 mL de disolución C, volviéndose a incubar la muestra durante 10 min en un baño a 50 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se ha de dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente, momento en el cual se puede medir su absorbancia a 650 nm frente a un blanco exento de proteína.

La concentración de proteína se conoce mediante la correspondiente recta de calibrado, obtenida utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

El contenido de las disoluciones A, B y C previamente mencionadas es el siguiente:

- Disolución A: 2 g de tartrato sódico-potásico y 100 g de carbonato sódico disueltos en 500 mL de hidróxido sódico 1 M y llevados a 1 L con agua destilada. Esta disolución tiene una validez de seis meses desde su preparación.
- Disolución B: 2 g de tartrato sódico-potásico y 1 g de sulfato cúprico pentahidratado disueltos en 90 mL de agua destilada y 10 mL de hidróxido sódico 1 M. Dicha disolución también tiene una validez de seis meses.

- Disolución C: disolución del reactivo de Folin-Ciocalteau en agua destilada con una proporción 1/15 (v/v). Esta disolución debe tener una normalidad comprendida entre 0.15 y 0.18 N y ha de preparase en el momento de ser usada.

3.2.3. Síntesis de los ésteres cetílicos.

3.2.3.1. Experimentos a presión atmosférica.

A pesar de que esta Tesis Doctoral se centra en la optimización del proceso de síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones, fue necesario realizar una serie de ensayos previos en los reactores de vidrio abiertos a la atmósfera descritos en el Apartado 3.1.2.2.

• Ensayos de esterificación previos.

Con el fin de verificar que los biocatalizadores utilizados para este trabajo presentaban una actividad adecuada para la síntesis de los ésteres cetílicos y del espermaceti, así como para confirmar que era oportuno llevar a cabo la síntesis en el reactor Parr 5101, en un primer momento se llevaron a cabo diversas reacciones de esterificación entre los ácidos que constituyen el espermaceti (por separado) y el alcohol cetílico.

De este modo, para comprobar la actividad de todos los derivados inmovilizados, se llevó a cabo la obtención de miristato de cetilo a 60 °C con 1 g de cada uno de ellos.

Asimismo, con el fin de corroborar los beneficios de la utilización del reactor de altas prestaciones, que permite retirar el agua generada durante la reacción, frente a la síntesis abierta a la atmósfera, se realizaron seis ensayos empleando Novozym[®] 435, tres en abierto y tres a vacío para la síntesis de miristato (a 60 °C con 0.1 g de biocatalizador), palmitato de cetilo (65 °C, 0.1 g de biocatalizador) y estearato de cetilo (70 °C, 0.5 g de biocatalizador).

Para ello, se introduce en el reactor la masa adecuada de ácido y alcohol para que la mezcla total de sustratos se de 20 g con una relación equimolecular (consultar Tabla 3.4). Los sustratos son fundidos haciendo circular agua a la temperatura requerida para el experimento a través del encamisado de reactor, proceso acelerado agitando a 350 rpm.

Una vez fundida y homogeneizada la mezcla reaccionante, se extrae una muestra inicial y se añade el biocatalizador, momento a partir del cual comienza a medirse el tiempo de reacción.

El seguimiento de la esterificación se realiza mediante la toma de muestras periódica, a las cuales se les determinará su número ácido tal y como se describe posteriormente en el Apartado 3.2.4.1. Durante todo el ensayo, y a excepción de los momentos de toma de muestra, el medio de reacción estará agitado de forma continua.

• Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción.

Con el fin de verificar si parte de la enzima inmovilizada sobre los biocatalizadores se liberaba al medio de reacción, se elaboraron una serie de experimentos siguiendo la metodología descrita a continuación.

En primer lugar se incuba durante una hora 0.5 g de derivado inmovilizado en la cantidad de alcohol cetílico fundido necesaria para sintetizar 20 g de miristato de cetilo. Este proceso se realiza en un reactor abierto a la atmósfera, a 70 °C y bajo una agitación de 350 rpm. Una vez transcurrido ese tiempo, se detiene el agitador y se deja reposar el contenido del reactor 15 min más, de forma que se tenga la certeza de que la totalidad del biocatalizador ha sedimentado, momento en el cual el alcohol es trasvasado a otro reactor que contiene la cantidad de ácido pertinente previamente fundida a 70 °C y agitada a 350 rpm. Tras esto, se toma muestra a diferentes intervalos de tiempo con el fin de constatar si el número ácido disminuye.

3.2.3.2. Ensayos a presión reducida.

La optimización del proceso de síntesis de espermaceti con los diversos biocatalizadores, se realizó en el reactor de altas prestaciones descrito en la Sección 3.1.2.3, ya que permite trabajar a vacío y bajo una atmósfera de humedad controlada.

Inicialmente, se introduce en el reactor la cantidad de sustratos correspondiente al ensayo que se va a realizar (Tabla 3.4) y se conecta el baño a la temperatura deseada. Una vez fundidos los reactivos, se procede a la puesta en marcha del equipo para el acondicionamiento del medio de reacción. Para ello en primer lugar se cierra herméticamente el reactor, se comienza la agitación y se abren las válvulas del cabezal del reactor que permiten la entrada de nitrógeno y la aplicación de vacío en el medio, de forma que el caudal de gas inerte sea igual a 54 L/h y la presión sea de 160 mmHg en todos los ensayos, parámetros que ya habían sido optimizados en anteriores trabajos del Grupo de Investigación sobre la síntesis enzimática de poliglicerol [183].

Transcurrido el tiempo necesario para que la mezcla reaccionante sea homogénea y se haya alcanzado la temperatura necesaria para el ensayo, se añade el biocatalizador, momento a partir del cual se considera iniciado el experimento.

Al igual que durante la síntesis a presión atmosférica, el seguimiento de la reacción se lleva a cabo mediante la extracción de muestras con la periodicidad adecuada, a las que se les determina el valor de su número ácido (Apartado 3.2.4.1).

Compuesto a -	Masa de reactivos (g)				
sintetizar	Ácido láurico	Ácido mirístico	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Alcohol cetílico
Laurato de cetilo	9.0487				10.9513
Miristato de cetilo		9.7012			10.2988
Palmitato de cetilo			10.2802		9.7198
Estearato de cetilo				10.7978	9.2022
Espermaceti	1.5138	3.7340	3.8349	0.8074	10.1099

Tabla 3.4- Pesos de reactivos a utilizar en la síntesis de los ésteres cetílicos por separado con relación molar 1:1 y de espermaceti, en una mezcla de reacción de 20 g.

A continuación, se detallan las series experimentales que se han ejecutado en este equipo.

• Influencia de la cantidad de biocatalizador.

El efecto de la concentración de derivado inmovilizado en el medio de reacción ha sido estudiado para los ésteres por separado, de forma que se han desarrollado un total de 16 experimentos para cada uno de los biocatalizadores. Las cantidades de éstos empleadas han sido: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g en todos los casos, excepto en el de Lipozyme[®] TL IM y Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH, con el que se realizó un experimento más con 2 g.

Durante esta serie, el resto de variables de operación se ha mantenido constante, de forma que todos los ensayos han sido realizados a 350 rpm y en las condiciones de atmósfera controlada previamente descritas. La temperatura seleccionada para estos ensayos es de 70 °C, ya que es la temperatura mínima más cercana al punto de fusión del ácido esteárico [184].

• Influencia de la temperatura de operación.

Esta serie consiste en tres experimentos por biocatalizador estudiado, y ha sido efectuada para la síntesis de espermaceti, a 350 rpm y con la cantidad de derivado inmovilizado determinada como óptima en el estudio anterior. Las temperaturas estudiadas fueron las mismas independientemente del biocatalizador utilizado: 60, 70 y 80 °C.

• Influencia de la velocidad de agitación.

En este caso, se ha evaluado el efecto de la velocidad de agitación en la síntesis de espermaceti únicamente para los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio. Para ello, se ha utilizado tanto la cantidad de derivado inmovilizado como la temperatura fijadas como óptimas, llevándose a cabo experimentos a 150, 250 y 350 rpm.

• Estudio de la estabilidad al almacenamiento de los biocatalizadores de Lipozyme[®] CALB L inmovilizada.

Con el fin de evaluar si los preparados enzimáticos hechos en el laboratorio mantienen su actividad con el paso del tiempo bajo unas condiciones de almacenamiento adecuadas (en un ambiente seco y refrigerado), se realizó una serie de ensayos de síntesis de miristato de cetilo con biocatalizador proveniente de una inmovilización concreta, justo después de su obtención, cuatro, ocho y doce meses después.

Esta serie experimental ha sido realizada en el reactor de altas prestaciones bajo las mismas condiciones de operación: 0.25 g de biocatalizador, 70 °C y 350 rpm.

• Ensayos a igualdad de cantidad de enzima en el medio.

Esta serie experimental consta de seis ensayos, en los que se comparan los biocatalizadores obtenidos en el laboratorio con Novozym[®] 435 en la síntesis de espermaceti a igualdad de cantidad de enzima en el medio de reacción (50 mg de lipasa), 70 °C y con una agitación de 350 rpm.

• Estudio de la reutilización de los biocatalizadores.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad operacional de todos los derivados inmovilizados, éstos fueron utilizados de forma consecutiva en 15 reacciones de síntesis de espermaceti. Las condiciones de operación seleccionadas fueron las óptimas en lo que respecta a cantidad de biocatalizador en el medio y temperatura de reacción, mientras que la velocidad de agitación se mantuvo constante en todos los ensayos, a 350 rpm, con el fin de que la estabilidad mecánica del propio soporte fuera un factor clave en esta serie experimental.

Dichos ensayos se llevaron a cabo sólo durante una hora, ya que los tiempos de reacción cortos facilitan la observación de variaciones en la conversión lograda, y por lo tanto en la actividad del biocatalizador. De este modo, tras una hora de reacción, el biocatalizador era dejado sedimentar para retirar el producto de reacción, lavado dos veces con 10 mL de acetona o hexano, filtrado y dejado secar al aire libre, tras lo cual era almacenado a 7 °C hasta su siguiente uso.

3.2.4. Métodos analíticos para la caracterización del producto de reacción.

3.2.4.1. Número ácido.

El número ácido (N.A.) se define como los miligramos de hidróxido potásico consumidos para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 g de muestra.

Su determinación se hace de acuerdo al método establecido en la normativa de la American Society for Testing and Materials (ASTM) [185]. Para ello se pesa con precisión una cierta cantidad de muestra, que se disuelve en una mezcla 1:1 (v/v) de etanol y éter etílico y se valora con una disolución de hidróxido potásico factorada con hidrógenoftalato potásico como patrón primario. Se utiliza fenolftaleína como indicador, por lo que se considera que la valoración ha alcanzado su punto de equivalencia cuando el color rosa persiste al menos durante 10 segundos. Dicha disolución se prepara disolviendo 0.2 g de fenolftaleína en 60 mL de etanol y llevándolos a 100 mL con agua destilada.

El valor del número ácido viene dado por la siguiente expresión:

$$N.A. = \frac{56.11 \times V \times f \times N}{m} \qquad \qquad Ec. 3.1$$

donde:

N.A. es el número ácido (mg KOH/g),

V es el volumen de KOH consumido (mL),

N es la normalidad de la disolución de KOH,

f es el factor de la disolución de KOH,

m es la masa de muestra (g).

A partir del valor del número ácido es posible definir la conversión (x) alcanzada en la muestra como:

$$x = \frac{N.A._0 - N.A._t}{N.A._0}$$
 Ec. 3.2

donde:

x es la conversión,

N.A.0 es el valor del número ácido al inicio de la reacción (mg KOH/g),

N.A.^{*t*} es el valor del número ácido a un tiempo dado de reacción (mg KOH/g).

Multiplicando la Ecuación 3.2 por cien, se puede expresar la conversión en términos de porcentajes.

3.2.4.2. Valor de hidroxilo.

El valor de hidroxilo (V.H.) representa los miligramos de hidróxido potásico requeridos para neutralizar el ácido acético libre de 1 g de muestra cuando ésta es acetilada bajo las condiciones que se describen seguidamente [186].

En primer lugar se hace un ensayo en blanco exento de muestra para conocer el volumen de disolución de hidróxido potásico necesario para neutralizar todo el ácido acético formado durante el análisis. Para ello, se introducen en un matraz de bola de 100 mL de capacidad 5 mL de una mezcla de piridina y anhídrido acético en una proporción 3/1 (v/v), que se calienta durante una hora al baño maría con el sistema de reflujo descrito en el Apartado 3.1.2.5, tras lo cual se deja enfriar. Una vez a temperatura ambiente, se añade 1 mL de agua por la parte superior de la columna de refrigeración y se vuelve a calentar durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavan las paredes del sistema de reflujo con 30 mL de éter dietílico y se valora con una disolución factorada de hidróxido potásico, usando fenolftaleína como indicador.

El análisis de la muestra se realiza siguiendo el mismo procedimiento, pero con el éster disuelto en la mezcla de piridina y anhídrido acético. Según el rango previsto para el valor hidroxilo de la muestra, se recomienda utilizar diferentes cantidades de muestra, como se recoge en la Tabla 3.5.

Para obtener resultados fiables en la determinación del valor de hidroxilo, se ha ser preciso a la hora de añadir el anhídrido acético y poner especial atención en que el material que se va a utilizar durante el ensayo esté perfectamente seco, puesto que este compuesto se hidroliza con facilidad.

El valor de hidroxilo se calcula mediante la siguiente expresión:

$$V.H. = \frac{56.11 \times (B-V) \times f \times N}{m} + N.A.$$
 Ec. 3.3

donde:

V.H. es el valor de hidroxilo (mg KOH/g),

B es el volumen de KOH consumido en el ensayo en blanco (mL),

V es el volumen de KOH consumido en el ensayo con muestra (mL),

N es la normalidad de la disolución de KOH,

f es el factor de la disolución de KOH,

m es la masa de muestra (g),

N.A. es el número ácido (mg KOH/g).
Rango de V.H. previsto (mg KOH/g)	Cantidad de muestra a pesar (g)
<250	2.5
250 - 300	2.0
300 - 450	1.5
450 - 650	1.0
650 - 1400	0.5

Tabla 3.5- Cantidad de muestra problema adecuada para la determinación del valor de hidroxilo.

3.2.4.3. Valor de saponificación.

El valor de saponificación (V.S.) de una muestra se expresa como los miligramos de hidróxido potásico necesarios para saponificar todos los ésteres y ácidos libres que se encuentran en 1 g de muestra [187].

Para determinar el valor de saponificación se requiere realizar un ensayo en blanco, en el que 40 mL de etanol y 20 mL de hidróxido potásico de concentración conocida son introducidos en un matraz de bola de 250 mL y calentados durante dos horas al baño maría en el sistema de reflujo previamente descrito. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar, y una vez a temperatura ambiente se añade fenolftaleína y se valora el exceso de hidróxido potásico con una disolución de ácido clorhídrico de concentración conocida.

El análisis de la muestra se hace siguiendo este mismo protocolo, pero introduciendo en el matraz 1 g de muestra pesado con precisión.

El valor de saponificación se obtiene de la siguiente expresión:

$$V.S. = \frac{56.11 \times (B - V) \times f \times N}{m} \qquad Ec. 3.4$$

donde:

V.S. es el valor de saponificación (mg KOH/g),

B es el volumen de HCl consumido en el ensayo en blanco (mL),

V es el volumen de HCl consumido en el ensayo con muestra (mL),

N es la normalidad de la disolución de HCl,

f es el factor de la disolución de HCl,

m es la masa de muestra (g).

3.2.4.4. Índice de yodo.

El índice de yodo de una muestra (I.Y.) es una medida del grado de insaturación de una sustancia y se expresa como los gramos de yodo añadidos por cada 100 g de muestra [188].

En el ensayo en blanco necesario para determinar este valor, se ha de realizar una mezcla de 20 mL de etanol y 25 mL de disolución de Wijs, que se deja en la oscuridad entre una y dos horas. Pasado este tiempo, se añade 100 mL de agua, 20 mL de yoduro potásico 0.1 N y se valora con una disolución de tiosulfato sódico 0.2 N. Como indicador se utilizan 2 mL de almidón, que no deben adicionarse hasta inmediatamente antes del punto de equivalencia, momento en el cual la disolución pierde el color amarillo del yodo. Al añadir el indicador, la disolución adquiere color azul oscuro, que vira a blanco en su punto de equivalencia.

El análisis de la muestra se hace de la misma forma que el ensayo en blanco, agregando inicialmente la cantidad de muestra especificada en la Tabla 3.6, que ha de ser pesada con precisión.

Rango de I.Y. previsto (g I ₂ /100 g)	Cantidad de muestra a pesar (g)
<5	3.00
5-20	1.00
21 - 50	0.40
51 - 100	0.20
101 - 150	0.13
151 - 200	0.10

Tabla 3.6- Cantidad de muestra problema adecuada para la determinación del índice de yodo.

Para preparar la disolución de tiosulfato sódico 0.2 N se disuelve en agua 50 g de tiosulfato sódico pentahidratado y 0.1 g de carbonato sódico, se adicionan tres gotas de cloroformo para inhibir la acción bacteriana y se lleva hasta 1 L con agua, tras lo cual la disolución se ha de dejar reposar un día antes de su uso. La factoración de la disolución se lleva a cabo con entre 0.14 y 0.16 g de dicromato potásico puro y seco, que se disuelven en 50 mL de agua. Una vez disueltos, se adicionan 2 g de yoduro potásico y 8 mL de ácido clorhídrico, se homogeniza la mezcla y se valora con la disolución de tiosulfato sódico utilizando almidón como indicador, cuyo viraje en este caso es de azul oscuro a verde claro.

La disolución de almidón necesaria tanto para la determinación del índice de yodo, como para la factoración de la disolución de valorante se ha de elaborar el mismo día que va a ser utilizada. Para ello, se forma una suspensión de 0.5 g de almidón soluble en 2 ó 3 mL de agua, a la cual se le añaden 50 mL de agua caliente, agitando de forma continua. Una vez hecho esto, hay que continuar calentando bajo agitación hasta que se obtenga una disolución

clara, que habrá que filtrar si tras unos minutos sin calentar sigue presentando turbidez. Finalmente, se deja enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente.

El valor del índice de yodo viene dado por la siguiente expresión:

$$I.Y. = \frac{12.69 \times (B - V) \times f \times N}{m} \qquad Ec. 3.5$$

donde:

I.Y. es el índice de yodo (g $I_2/100$ g),

B es el volumen de Na₂S₂O₄ consumido en el ensayo en blanco (mL),

V es el volumen de Na₂S₂O₄ consumido en el ensayo con muestra (mL),

N es la normalidad de la disolución de Na₂S₂O₄,

f es el factor de la disolución de Na₂S₂O₄,

m es la masa de muestra (g).

3.2.4.5. Determinación del contenido en agua por el método Karl Fischer.

La valoración Karl Fischer (K.F.) es uno de los métodos analíticos más extendidos para la medida de la humedad de una muestra debido a su rapidez y a que permite determinar un amplio rango de concentraciones de agua. Se basa en la reacción de oxidación-reducción entre el yodo y el dióxido de azufre, proceso que sólo se produce en presencia de agua y que es conocido como reacción de Bunsen.

Existen dos métodos para llevar a cabo la valoración Karl Fischer, por volumetría y por coulombimetría. Ésta última técnica es especialmente adecuada para muestras con un bajo contenido en agua, y es la que ha sido empleada en este trabajo de la forma que se detalla a continuación.

Una vez acondicionado el equipo (Apartado 3.1.2.5), se introduce en el horno un vial sellado con la muestra y se especifica la cantidad exacta de producto a analizar (aproximadamente 1 g), iniciándose la valoración. Para ello, la muestra es calentada a 110 °C de forma que el agua contenida en la muestra se libera en estado gaseoso y es arrastrada mediante una corriente de aire seco a la célula de coulómetro (tanque de valoración), donde el electrodo de generación produce de forma estequiométrica el yodo necesario para determinar el contenido de agua. El punto final es detectado por un electrodo indicador de platino, siendo el propio equipo el que calcula la cantidad de agua en función la corriente y el tiempo necesarios para concluir la determinación.

Se ha de tener en cuenta que para conseguir unos resultados fiables, el propio fabricante del coulómetro Karl Fischer recomienda la realización de entre tres y cinco ensayos en blanco con viales sellados vacíos, de forma que se elimine cualquier traza de humedad presente en el equipo previamente a la determinación.

3.2.4.6. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

El análisis de las muestras mediante HPLC se ha realizado empleando el cromatógrafo descrito en la Sección 3.1.2.5, bajo las siguientes condiciones:

- Elución isocrática.
- Fase móvil compuesta por una mezcla 25/75 (v/v) de acetona/acetonitrilo.
- Caudal de fase móvil de 2 mL/min.
- Temperatura 35 °C.
- Volumen de inyección de 20 µL.
- Longitud de onda para la detección del analito de 212 nm.

La preparación de las muestras consiste en disolverlas en una mezcla con proporción 2/1 (v/v) de tetrahidrofurano/acetonitrilo, de forma que la concentración en muestra de dicha disolución sea de 10 ó 20 mg/mL.

3.2.5. Formulación de una emulsión cosmética estándar.

Con el fin de estudiar la aplicación y el efecto de los ésteres sintetizados en el desarrollo de un producto cosmético, se elaboraron diversas emulsiones de aceite en agua (O/W) siguiendo el patrón y las proporciones de una crema hidratante tipo [91]. De este modo, se desarrollaron 200 g de cada crema siguiendo exactamente el mismo protocolo, de forma que la única diferencia entre ellas se encuentre en su composición, como se puede observar en la Tabla 3.7.

El proceso de formulación comienza calentando los componentes de la fase oleosa (A), bajo agitación, a 75 °C. Simultáneamente se constituye la fase acuosa (B): en otro recipiente se mezclan el agua y la glicerina, tras lo cual se espolvorea poco a poco el agente gelificante sobre ellas y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido este tiempo, la fase B se calienta a 75 °C, se le añade el agua perdida por evaporación e inmediatamente después se le agrega la fase A. Dicho proceso se realiza utilizando el ULTRA-TURRAX[®] descrito en el Apartado 3.1.2.4, que permite llevar a cabo la mezcla de ambas fases a una velocidad de agitación de 11000 rpm, que se mantiene durante 1.5 min. Una vez formada la emulsión, se mantiene la agitación con la hélice desfloculadora (Turbotest) a 350 rpm hasta que la temperatura de la mezcla sea inferior a 50 °C, momento en el cual se adiciona gota a gota la cantidad de disolución de hidróxido sódico necesaria para alcanzar un pH entre 6.2 y 6.5. Conforme la emulsión se va espesando, se aumenta la agitación a 500 – 600 rpm, y se deja enfriar hasta 40 °C antes de añadir el conservante. Tras esto, la crema se desgasifica mediante la ayuda de un cristalizador cerrado conectado a una bomba de vacío, se introduce en botes cerrados (500 mL de capacidad, 90 mm de diámetro) y se deja reposar un día antes de su uso.

				Cont (% en	enido peso)
Fase	Ingrediente	Nombre INCI	Función	Emulsión control	Emulsión con muestra
	DUB 340	cetyl alcohol, glyceryl stearate, PEG-75 stearate, ceteth-20, steareth-20	emulsificante	5	5
A (classe)	DUB 810C	coco caprylate/caprate	emoliente	14	7
(oleosa)	Arlamol HD	isohexadecane	emoliente	8	4
	Éster cetílico o espermaceti		emoliente	0	11
	Agua	aqua		66.7	66.7
В	Glicerina	glycerin	humectante	5	5
(acuosa)	Ultrez 10	carbomer	agente gelificante	0.3	0.3
	Disolución de hidróxido sódico 10%	sodium hydroxide	regulador del pH	csp ^a pH 6.2 – 6.5	csp ^a pH 6.2 – 6.5
С	Isocide SMM	propylene glicol, methylpropanediol, postassium sorbate, methylisothiazolinone	conservante	1	1

 Tabla 3.7- Composición de las emulsiones de aceite en agua.

^a csp: cantidad suficiente para

3.2.6. Análisis de las propiedades de una emulsión cosmética.

3.2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un método de análisis térmico de gran utilidad, ya que permite determinar, entre otros, temperaturas características (puntos de fusión, congelación, transición vítrea, etc.), entalpías, calor específico y estabilidad térmica tanto de compuestos puros como de mezclas. Es por ello que esta técnica analítica fue utilizada para analizar las emulsiones, la fase oleosa con y sin emulsificante, los ésteres y el espermaceti biotecnológico. De este modo, se pesa con precisión el producto (10 mg para los ingredientes puros o la fase oleosa y de 30 mg para las emulsiones) dentro de una cápsula de aluminio para DSC, que se sella herméticamente. El calorímetro utilizado consta de dos hornos independientes en los que se introduce sendas cápsulas: una que contiene la muestra y otra llena de aire, que actúa como celda de referencia, tras lo cual se cierra el cabezal del equipo y se comienza el programa de temperaturas indicado: en primer lugar se mantiene las muestras a 0 °C durante un minuto, tras el cual se aumenta la temperatura a razón de 10 °C/min hasta 90 °C, momento en que se da por finalizado el análisis y el equipo comienza a enfriarse para la siguiente muestra.

3.2.6.2. Análisis de textura.

El análisis de la textura de una emulsión permite determinar algunas sus principales características mecánicas a través de diversas pruebas, de entre las cuales se ha seleccionado la determinación de la penetrabilidad y la extensibilidad de la crema.

Como se ha señalado en el Apartado 3.1.2.5, los ensayos de penetración han sido realizados en un texturómetro dotado de la sonda P/0.5R y de una cabina que permite realizar pruebas a temperatura controlada. De este modo, el análisis comienza con el acondicionamiento de la crema a la temperatura deseada (10, 20, 30, 40 y 50 °C), tras lo cual se acciona el equipo de forma que la sonda descienda de forma constante a la velocidad seleccionada, 5 mm/s, hasta introducirse en la crema 15 mm, momento en el cual vuelve a su posición inicial con la misma velocidad.

Para llevar a cabo las pruebas de extensibilidad, se deposita la emulsión en forma de cuatro líneas de 50 μ L, paralelas e igualmente distanciadas, sobre la placa HelioplateTM HD 2 del dispositivo móvil. Acto seguido, y poniendo especial atención en no esparcir la muestra manualmente, el móvil metálico se deposita en la posición de salida y se acciona el mecanismo que hace que el móvil se desplace a la longitud (120 mm) y velocidad (3 mm/s) seleccionadas.

3.2.6.3. Granulometría por difracción láser.

Para conocer la distribución en volumen de las gotas que componen la emulsión, se prepara una predispersión de las cremas mezclando suavemente 0.5 mL de estás con agua ultrapura. Esta predispersión es a su vez diluida de nuevo en agua en la propia celda de medida, de forma que el valor de absorbancia de la disolución final sea de 0.2 ± 0.02 . Tras esto, se acciona el sistema de agitación de la cubeta con el fin de asegurar que la distribución de partículas sea homogénea en toda ella, y se mide utilizando un índice de refracción de 1.45 \pm 0.01i, valor determinado previamente en la fase grasa de la crema. Dicho ensayo se ha de llevar a cabo a temperatura ambiente, tras realizar un blanco con agua ultrapura.

3.2.6.4. Microscopía óptica.

Con el fin de comprobar si las distintas emulsiones eran estables en el tiempo desde un punto de vista estructural, se hizo un seguimiento por observación microscópica el primer, sexto y noveno día tras la formulación de las cremas. Para ello se han de tomar tres muestras de cada una: en su superficie, en su mitad y en el fondo que toca el recipiente que la contiene, y se introduce cada una entre dos láminas de vidrio, tras lo cual son observadas con luz transmitida a través del objetivo, que proporciona el aumento seleccionado (en este caso, 200 veces el tamaño real de los elementos). Una vez ajustada la imagen de forma nítida, se puede realizar fotografías de la muestra, que se almacenan en el ordenador conectado al equipo.



4. Resultados y discusión

4. Resultados y discusión.

Como ya se ha mencionado en los Antecedes de este trabajo, la utilización de enzimas como catalizadores de procesos industriales conlleva una serie de ventajas operacionales y medioambientales debidas a su gran selectividad y su capacidad para trabajar bajo condiciones de reacción moderadas. Además, en el caso de la obtención de ingredientes cosméticos, el empleo de biocatalizadores aporta un valor añadido extra al producto ya que puede ser etiquetado como "natural", lo que los hace más competitivos en un mercado cada vez más condicionado por las exigencias de los consumidores.

En consecuencia, en esta Tesis Doctoral se propone el uso de derivados inmovilizados con distintas características para llevar a cabo la síntesis de una mezcla de ésteres similar al blanco de ballena natural, previamente extraído de los cachalotes. Los resultados de este trabajo se presentan tal y como se describen a continuación.

El primer apartado describe el proceso de obtención de espermaceti empleando biocatalizadores comerciales. Los siguientes dos capítulos están dedicados la elaboración de varios catalizadores por inmovilización de la isoenzima B de *Candida antarctica* y su utilización en la optimización de la síntesis de espermaceti. En el cuarto apartado, se estudia la cinética del proceso de síntesis de espermaceti tras lo cual se establece una comparación general del rendimiento de los diferentes derivados inmovilizados en el quinto capítulo. El sexto apartado trata de la caracterización de los ésteres enzimáticos del espermaceti como ingredientes cosméticos, tanto solos como en una formulación. Finalmente, se aborda un pequeño estudio económico del proceso de esterificación a escala de laboratorio.

4.1. Obtención de espermaceti biotecnológico con derivados inmovilizados comerciales.

4.1.1. Estudios previos en un reactor abierto.

4.1.1.1. Comprobación de la actividad de los biocatalizadores comerciales.

Como ha quedado expuesto en la Tabla 3.1 de Materiales y métodos y en el Anexo I, los biocatalizadores comerciales escogidos para llevar a cabo la presente Tesis Doctoral están elaborados a partir de lipasas de diversas fuentes inmovilizadas sobre soportes de distinta naturaleza. Es por ello que en primer lugar se realizaron una serie de ensayos para comprobar que estos derivados eran aptos para la obtención de un producto biotecnológico similar al espermaceti natural. Así, siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.2.3.1 se llevó a cabo la esterificación entre el ácido mirístico y el alcohol cetílico en un reactor abierto a la atmósfera y en un medio libre de disolventes, cuyos resultados se recogen en el Anexo II.

Durante dichos experimentos, se constató que con todos los biocatalizadores empleados el número ácido de las muestras variaba con el tiempo de forma similar, disminuyendo rápidamente durante los instantes iniciales del ensayo para luego estabilizarse en un valor. Teniendo en cuenta que, tal y como se explica en la Sección 3.2.4.1, a partir del número ácido es posible calcular la conversión alcanzada para un momento dado, a modo de ejemplo, en la Figura 4.1 se muestra de forma gráfica dichas observaciones expresadas tanto en términos de número ácido (N.A.) como de conversión para el derivado inmovilizado de *Candida antarctica*, CalB immo Plus.



Figura 4.1- Síntesis de miristato de cetilo en un reactor abierto utilizando 1 g de CalB immo Plus (20 g, 1:1, 60 °C, 350 rpm).

De este modo, la conversión obtenida tras una hora de reacción se halla comprendida entre un 90 y un 96.5% dependiendo del derivado inmovilizado, alcanzándose el valor en equilibrio para este parámetro en torno a las dos horas de ensayo.

Por lo tanto, en vista de estos resultados, no sólo se puede afirmar que los biocatalizadores comerciales seleccionados pueden llevar a cabo la esterificación del ácido mirístico con el alcohol cetílico, sino que presentan las características necesarias para la síntesis transcurra a una velocidad adecuada, incluso siendo un proceso en el que la elevada viscosidad de los reactivos puede ser un factor limitante desde un punto de vista cinético. Estos resultados apuntan además a que estos derivados de lipasa presentarán unas propiedades convenientes para la síntesis "solvent-free" del resto de sustancias que componen el análogo del blanco de ballena.

4.1.1.2. Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción.

Puesto que las fuerzas que intervienen en el proceso de adsorción física de una enzima en un soporte no siempre son los suficientemente intensas para garantizar que ésta no es liberada en el medio de reacción, y teniendo en cuenta la afinidad de las lipasas por los medios de naturaleza hidrófoba o las interfases agua-aceite, se decidió realizar el estudio de la desorción de la lipasa inmovilizada en los biocatalizadores.

Esta serie experimental se desarrolló bajo unas condiciones similares a las que se emplearían en una reacción en lo que respecta a la masa de reactivos y su relación molar, la temperatura y velocidad de agitación del medio y la cantidad de biocatalizador puesto a prueba, de forma que las observaciones realizadas sobre el sistema de estudio sean un reflejo lo más fidedigno posible de los ensayos realizados para este trabajo.

Para ello, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.2.3.1, se incubó durante una hora cada uno de los biocatalizadores en presencia de alcohol cetílico, tras lo cual dicho reactivo era trasvasado exento de derivado inmovilizado a otro reactor que contenía ácido mirístico a la misma temperatura y bajo agitación, momento en el cual se iniciaba la toma periódica de muestras para determinar posteriormente el número ácido de la mezcla. Los resultados de dichos ensayos, reflejados en la Figura 4.2, se pueden consultar en forma numérica en el Anexo II.

Como se puede apreciar en dicha figura, las pequeñas variaciones de entre una y cinco unidades en valor del número ácido de las muestras recogidas a lo largo del tiempo se dieron de forma aleatoria, ya que vienen provocadas por los pequeños errores experimentales asociados a las valoraciones llevadas a cabo de forma manual necesarias para determinar el valor del número ácido. Por lo tanto, se puede afirmar que aparentemente, bajo las condiciones de reacción dadas no se produjo la desorción de la lipasa contenida en ninguno de los productos comerciales.



Figura 4.2- Estudio de la desorción de la lipasa contenida en los biocatalizadores comerciales (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm).

4.1.1.3. Influencia de la presencia de humedad en el medio de reacción.

Durante la síntesis en un reactor abierto a la atmósfera, la humedad ambiental y la temperatura del proceso son los parámetros que controlan qué cantidad del agua generada durante la esterificación se transferirá al medio circundante por evaporación. Consecuentemente, el valor de humedad supone una variable más a considerar, ya que dependiendo de ésta, el equilibrio que se establezca favorecerá en mayor o menor medida el proceso de síntesis. Además, se ha de tener en cuenta que la humedad del aire está muy condicionada por variaciones estacionales y meteorológicas, por lo que se pueden dar fluctuaciones diarias en su valor que afecten a la repetitividad de los resultados de la experimentación [165].

Cabe esperar por lo tanto que el control de la cantidad de agua presente en el sistema de reacción sea un aspecto clave para alcanzar un buen rendimiento en este tipo de procesos a nivel industrial, y actualmente existen diferentes tecnologías para conseguirlo, tales como la pervaporación [130,189], las resinas de intercambio iónico [190], los tamices moleculares [191,192] o la utilización de sistemas a presión reducida [193,194]. Éste último método ha sido el elegido para evaluar el efecto de la eliminación del agua del medio de reacción, ya que la aplicación de vacío es una buena herramienta para la producción "solvent-free" a gran escala de ésteres de ácidos grasos al no existir el riesgo de eliminar compuestos volátiles junto al agua [138].

Así pues, se ha comparado la síntesis de miristato, palmitato y estearato de cetilo bajo las mismas condiciones empleando el reactor abierto a la atmósfera y el reactor de altas prestaciones descrito en el Apartado 3.1.2.3, obteniéndose los resultados presentados a continuación y que se pueden consultar con más detalle en el Anexo II. Como se puede ver en las Figuras 4.3 y 4.4, en las que se ha representado los primeros 240 min de los ensayos llevados a cabo con 0.1 g de Novozym[®] 435, la utilización del reactor de altas prestaciones no supone una mejora significativa de la velocidad de reacción frente a la síntesis a presión atmosférica para los ensayos en los que la cantidad de biocatalizador utilizada es baja, obteniéndose en ambos equipos conversiones similares para el mismo tiempo de reacción, un comportamiento similar al constatado anteriormente en trabajos del Grupo de Investigación [195,196].



Figura 4.3- Comparación de la síntesis de miristato de cetilo utilizando 0.1 g de Novozym[®] 435 a presión atmosférica y a presión reducida (20 g, 1:1, 60 °C, 350 rpm).



Figura 4.4- Comparación de la síntesis de palmitato de cetilo utilizando 0.1 g de Novozym[®] 435 a presión atmosférica y a presión reducida (20 g, 1:1, 65 °C, 350 rpm).

Sin embargo, para el ensayo con 0.5 g de Novozym[®] 435 se aprecia una diferencia de unas 17 unidades porcentuales entre los valores de conversión conseguidos en abierto y a vacío a los 15 min de ensayo (Figura 4.5). Esto podría explicarse a que al aumentar la velocidad de la reacción debido a la presencia de una mayor concentración de enzima inmovilizada, la cantidad de agua generada para un mismo intervalo de tiempo es mayor que con 0.1 g de biocatalizador, por lo que la utilización de un sistema inmediato de eliminación de la humedad presente en el medio de reacción revierte de forma beneficiosa en la cinética de la esterificación.



Figura 4.5- Comparación de la síntesis de estearato de cetilo utilizando 0.5 g de Novozym[®] 435 a presión atmosférica y a presión reducida (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm).

Asimismo, en la Tabla 4.1 se puede constatar que es mediante el uso del equipo a vacío que se alcanzan los valores más bajos de número ácido final, ya que la eliminación del agua contenida en el medio de reacción permite desplazar el equilibrio de la reacción en el sentido de la síntesis. Este hecho, junto con el de asegurar la repetitividad de los resultados, justifica sobradamente el uso de este reactor más allá de con el fin de mejorar la cinética de las reacciones con mayores cantidades de biocatalizador, ya que la síntesis a presión reducida consigue niveles conversión más altos y asegura que los productos finales cumplan con las especificaciones de los fabricantes de dichos productos (Tabla 2.2 de Antecedentes).

Tabla 4.1- Número ácido final alcanzado en los ensayos comparativos a presión atmosférica y a vacío.

Compuesto	N.A. final (mg	KOH/g)
sintetizado	Presión atmosférica	Vacío
Miristato de cetilo	3.44	1.22
Palmitato de cetilo	2.46	1.99
Estearato de cetilo	2.75	1.36

4.1.2. Optimización del proceso de síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones.

4.1.2.1. Influencia de la concentración de biocatalizador.

De los resultados de algunos de los experimentos expuestos en el apartado anterior, resulta evidente que la velocidad de la reacción de esterificación de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico con el alcohol cetílico dependerá en gran medida (aunque no únicamente) de la cantidad de derivado inmovilizado utilizado durante el proceso. Así, mientras que la elección de concentraciones de biocatalizador bajas podría conducir a unos tiempos de reacción demasiado lentos, un exceso de éste puede acarrear problemas de transferencia de materia por la formación de aglomeraciones en el medio de reacción, así como incrementar innecesariamente los costes de producción, ya que no se debe olvidar que los preparados enzimáticos son productos relativamente caros [125].

Por lo tanto, en primer lugar se estudió, para los preparados comerciales, la influencia de la cantidad de derivado inmovilizado en el medio de reacción durante la síntesis de los ésteres que componen el espermaceti por separado. Tal y como se describe en el Apartado 3.2.3.2, se realizaron diversos ensayos en los que se varió la cantidad de biocatalizador entre 0.125 y 1 g para los derivados inmovilizados de *Candida antarctica* (CalB) y *Rhizomucor miehei* (Rml), lo que supone una concentración de biocatalizador de entre un 0.625% y un 5% (w/w) referido a los sustratos. Asimismo, se ha llevado a cabo un experimento más con una concentración del 10% (2 g) para el preparado de *Thermomyces lanuginosus* (TII), manteniéndose constantes en cualquiera de los casos el resto de parámetros: 20 g de sustratos con relación molar 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg.

A continuación, se muestran de forma gráfica los resultados obtenidos de la síntesis de cada uno de los cuatro ésteres cetílicos con los biocatalizadores de lipasa comerciales CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM, cuyos valores numéricos se hallan en el Anexo III. Para ello se ha representado en Figuras 4.6 a 4.9 el valor de conversión alcanzado a diferentes tiempos de ensayo, puesto que el hecho de que el número ácido inicial disminuya conforme aumenta el peso molecular del ácido utilizado, dificulta un análisis pormenorizado del proceso de síntesis de los ésteres cetílicos.

De este modo, en primer lugar cabe destacar que todos los preparados comerciales seleccionados son capaces de sintetizar cada uno de los ésteres del blanco de ballena por separado, observándose en la mayoría de casos un comportamiento no lineal en la conversión alcanzada a lo largo del tiempo, ya que ésta aumenta considerablemente en primer lugar para luego acabar estabilizándose, momento en el que se alcanza el equilibrio de la reacción.



Figura 4.6- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.7- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.8- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.9- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

De la observación de dichas figuras, resulta evidente además que un aumento de la cantidad de derivado inmovilizado en el medio de reacción mejora la velocidad de esterificación, ya que se incrementa el número de centros activos disponibles para interactuar con los sustratos. No obstante, dicho efecto sobre la cinética del proceso no es proporcional a la concentración de biocatalizador, como queda patente al estudiar el valor de la conversión en un momento dado para cualquiera de ellos. Así, tomando como ejemplo los resultados obtenidos a los 15 min de reacción para Lipozyme[®] TL IM (Tabla 4.2), se observa que la conversión alcanzada al aumentar la cantidad de biocatalizador a 0.25 g es, según el éster sintetizado, entre un 1.3 y 2.6 veces mayor que la obtenida a trabajar con 0.125 g. Asimismo, al incrementar la masa de derivado de 0.25 a 0.5 g la conversión se multiplicó entre 1.9 y 2.7 veces, al pasar a 1 g, ~2.0 veces, y entre 1.7 y 2.1 veces al doblar de nuevo la cantidad de biocatalizador hasta 2 g, por lo que no existe ninguna conexión general entre estos resultados.

Además, para el propio Lipozyme[®] TL IM, no es posible observar ninguna correlación clara entre la cantidad de biocatalizador y la conversión basándose en el análisis de muestras retiradas a otros intervalos de tiempo antes de alcanzar claramente la zona de equilibrio. Así, en la Tabla 4.2 se puede ver que a los 60 min de ensayo, la conversión se multiplica entre 1.8 y 2.1 veces al pasar de 0.125 a 0.25 g, al doblar la masa de biocatalizador de 0.25 a 0.5 g y de 0.5 a 1 g la conversión se multiplica en ~2.1 y ~1.5 veces respectivamente, mientras que al duplicar de nuevo la cantidad de Lipozyme[®] TL IM a 2 g, el incremento en el valor de la conversión es mínimo. Dichas observaciones son extensibles a los resultados obtenidos durante los ensayos realizados con los otros derivados comerciales.

	Contidad da		Convers	sión (%)	
	biocatalizador	Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo
	0.125 g	5.80	3.53	4.15	3.86
n	0.25 g	7.29	9.03	10.21	6.62
5 mi	0.5 g	17.04	19.60	19.38	17.85
T	1 g	33.79	41.61	40.49	35.19
	2 g	71.51	72.35	70.35	64.34
	0.125 g	15.44	16.91	15.77	13.58
n	0.25 g	29.34	30.12	29.33	28.60
0 mi	0.5 g	61.36	62.74	60.47	61.20
9	1 g	92.84	93.72	91.98	91.58
	2 g	96.91	96.73	96.07	96.17

Tabla 4.2- Conversión alcanzada a los 15 y 60 min de reacción durante la síntesis de los ésteres cetílicos por separado empleando Lipozyme[®] TL IM.

Comparando los resultados obtenidos para los distintos catalizadores enzimáticos, resulta evidente además que la conversión alcanzada para una concentración y un tiempo (corto) utilizando el biocatalizador de TII es muy inferior a la obtenida con cualquiera de los otros inmovilizados comerciales. Este hecho podría tener su origen en el carácter polar del soporte utilizado en la elaboración de Lipozyme[®] TL IM, un silicato catiónico, ya que éste no resultaría apropiado para trabajar con sustancias tan hidrófobas. Otros trabajos describen un comportamiento similar para este mismo biocatalizador en la síntesis solvent-free de estólidos de ricinoleato de metilo [166] o de ésteres saborizantes en presencia de disolventes [171], aunque los autores proponen la especificidad 1,3 de TII a la hora de explicar sus hallazgos. En este sentido, durante su estudio sobre la especificidad de sustrato de diferentes lipasas en la hidrólisis de ésteres, Naik et al. [146] pusieron en evidencia que mientras que CalB presenta una buena actividad en la hidrólisis de compuestos derivados de ácidos de cadena larga, TII era menos propensa a romper el enlace éster de dichos sustratos, lo que podría justificar también la menor actividad de Lipozyme[®] TL IM durante la obtención de los ésteres cetílicos si extrapolamos estos resultados al proceso de síntesis.

El trabajo anteriormente citado también demostró que mediante el uso de Rml se alcanzaban buenos rendimientos en la hidrólisis de los ésteres con la parte ácida lineal más larga [146]. Este hecho explicaría pues los resultados logrados en las esterificaciones catalizadas por Lipozyme[®] RM IM (Figura 4.8), ya que dicho derivado inmovilizado exhibió una alta actividad a pesar de las características hidrófilas de la resina Duolite ES 562.

En lo que concierne a los biocatalizadores comerciales de CalB, Novozym[®] 435 y CalB immo Plus, se observa que ambos presentan resultados similares y las mayores velocidades de reacción, lo que podría deberse al doble efecto positivo de la naturaleza de la lipasa, ya que CalB resulta ser una enzima muy activa frente a una amplia gama de ésteres [144], y de la naturaleza hidrófoba de los soportes empleados en la elaboración de ambos productos. Cabe destacar además, que no se puede observar un efecto importante del tamaño de poro de ambos biocatalizadores, que se puede consultar en la Tabla 3.1 de Materiales y métodos, quizá por encontrarse enmascarado por el contenido en lipasa de ambos preparados, dato que no ha sido facilitado por el fabricante de CalB immo Plus.

Por otra parte, con el fin de estudiar la influencia de la longitud de cadena de los sustratos durante la síntesis, se ha calculado la velocidad de reacción a los 15 min para una cantidad fija de cada uno de los biocatalizadores estudiados, cuyos resultados se comparan en la Tabla 4.3. En ella se aprecia que, de forma general, la velocidad de la esterificación decrece conforme aumenta la cadena de carbono de las especies implicadas en el proceso. Esta tendencia se da para todos los biocatalizadores, siendo Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] TL IM el menos y el más afectado por este factor, respectivamente. No obstante, el efecto de la longitud de cadena es evidente sólo en los ensayos realizados para la mayor concentración de derivado inmovilizado, ya que en ese caso la etapa controlante del proceso debe ser consecuencia de las limitaciones de transferencia de materia y difusión de los sustratos y productos, mientras que la propia cinética de la reacción podría ejercer un efecto visible en la velocidad de los experimentos llevados a cabo con concentraciones de biocatalizador menores. Así pues, resulta evidente que, si bien existen diferencias en la velocidad del proceso con respecto del

éster sintetizado, a efectos prácticos es la concentración de biocatalizador en el medio de reacción la que condiciona mayoritariamente el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio químico.

Tabla 4.3- Velocidad de reacción para un tiempo de operación de 15 min, en los ensayos realizados a mayor cantidad de biocatalizador (1 g de CalB immo Plus, Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] RM IM; 2 g de Lipozyme[®] TL IM).

	Ve	locidad de reacció	ón (ΔN.A./min)	
Compuesto sintetizado	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
Laurato de cetilo	7.71	7.73	7.60	6.34
Miristato de cetilo	7.20	7.35	6.58	5.88
Palmitato de cetilo	6.31	7.19	6.31	5.53
Estearato de cetilo	6.19	6.34	5.69	4.68
Disminución de velocidad entre laurato y estearato (%)	19.71	17.98	25.13	26.18

Finalmente, cabe destacar que exceptuando los experimentos realizados con las cantidades más pequeñas de Lipozyme[®] TL IM (0.125 y 0.25 g), tras 6 h de reacción (o menos) se obtuvo siempre productos cuyo número ácido es inferior a 3 mg KOH/g, valores recomendados en las hojas de especificaciones de los fabricantes, por lo que, teniendo en cuenta todos los resultados expuestos en este apartado, se puede fijar la cantidad óptima de biocatalizador en 0.5 g (2.5% (w/w) de derivado en el medio) para los derivados de CalB y Rml y en 1 g (5% de concentración) para el de Tll.

4.1.2.2. Influencia de la temperatura de operación.

Uno de los parámetros claves a controlar en los procesos biotecnológicos es la temperatura del medio de reacción, que ha de garantizar una actividad adecuada de la enzima sin condicionar su estabilidad. Por lo general, la velocidad de las reacciones catalizadas por lipasas aumenta con la temperatura siguiendo la ecuación de Arrhenius, y dependiendo del pH, muchas lipasas en su forma libre encuentran sus condiciones óptimas de trabajo entre los 30 y los 60 °C, temperaturas a partir de las cuales se puede desencadenar su proceso de desnaturalización [197]. Afortunadamente, las técnicas de inmovilización permiten aumentar el valor óptimo de este parámetro con respecto al de la lipasa libre, haciendo que estas enzimas sean funcionales sin pérdidas significativas de su actividad a altas temperaturas durante tiempos de operación largos [144,197].

Trabajar a temperaturas elevadas supone además una mejora de los fenómenos de transporte de materia dentro del medio de reacción, ya que permite reducir su viscosidad y favorece el proceso de difusión de reactivos y productos [140,196]. Por ende, la temperatura de operación óptima será la que garantice tanto los requerimientos de estabilidad del biocatalizador como unas condiciones de reacción que permitan alcanzar una buena productividad y economía del proceso.

En vista de ello, se realizó un estudio para determinar la temperatura de trabajo más adecuada para la síntesis simultánea de laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo en unas proporciones similares a las del espermaceti natural. Para ello se llevaron a cabo experimentos a 60, 70 y 80 °C, empleando las cantidades de biocatalizador determinadas como óptimas anteriormente, esto es: 0.5 g para los derivados de CalB y Rml y 1 g para el de Tll. Asimismo, los valores de la velocidad de agitación, vacío y caudal de nitrógeno permanecieron constantes e iguales a los empleados en ensayos previos.

Los resultados de esta serie experimental se recogen la en el Anexo III así como en la Figura 4.10, en la que se han representado sólo las dos primeras horas de reacción para una mejor visualización de los datos. Como cabía esperar, todos los biocatalizadores comerciales son capaces de sintetizar la mezcla de ésteres cetílicos del blanco de ballena de manera que la variación de la conversión a lo largo del tiempo de ensayo se produce de forma semejante a la de los cuatro ésteres por separado.

Tal y como se puede constatar, CalB immo Plus, Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] RM IM no parecen sufrir fenómenos de desactivación térmica entre 60 y 80 °C, de modo que la velocidad de reacción se incrementa con la temperatura y el tiempo de operación requerido para alcanzar el equilibrio es por lo tanto ligeramente inferior. El efecto favorable de la temperatura sobre los derivados inmovilizados de CalB y Rml podría estar debido a que ésta reduce la viscosidad del medio a la vez que aumenta la velocidad de evaporación del agua generada durante la esterificación (de modo que el equilibrio se desplace en sentido de la síntesis). Además, la constante cinética del proceso se ve también favorecida por dicho aumento de la temperatura.

En lo que respecta al biocatalizador de Tll, se observa que la temperatura mejora la velocidad de reacción sólo hasta los 70 °C, de forma que al incrementar de nuevo en 10 °C la temperatura del medio hasta 80 °C las conversiones alcanzadas para un mismo intervalo de tiempo son menores, lo que pone en evidencia que Lipozyme[®] TL IM es menos resistente a la temperatura. A pesar de que Tll es considerada una enzima termófila, algunos autores han constatado las consecuencias negativas de la temperatura sobre este biocatalizador comercial, ya sea en reacciones de esterificación [171], como de alcoholisis [198] o de transesterificación, habiéndose descrito en esta última publicación una disminución de la actividad de Lipozyme[®] TL IM incluso a 40 °C [199].



Figura 4.10- Síntesis de espermaceti a varias temperaturas utilizando 0.5 g de CalB immo Plus (a), Novozym[®] 435 (b), Lipozyme[®] RM IM (c) y 1 g de Lipozyme[®] TL IM (d) en el reactor de altas prestaciones (20 g, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En vista de los resultados obtenidos, se consideró 70 °C como temperatura óptima en todos los casos, puesto que al trabajar a temperaturas superiores, la mejora de la velocidad de reacción no es lo suficientemente grande como para compensar el aumento de consumo de energía, mientras que seleccionar 60 °C como temperatura para el proceso conllevaría tiempos de acondicionamiento inicial de los reactivos demasiado largos debido a su elevado punto de fusión.

Al llevar a cabo la síntesis de blanco de ballena bajo las condiciones de operación determinadas como óptimas, CalB immo Plus y Novozym[®] 435 necesitaron tan sólo una hora para alcanzar conversiones ligeramente superiores al 97%, siendo la conversión final, una vez alcanzado el equilibrio de la reacción, del ~98.5%. Por su parte, el derivado inmovilizado de Rml, Lipozyme[®] RM IM, requirió 90 min para alcanzar un 97% de conversión mientras que al final del ensayo ésta fue de un 98.1%. Lipozyme[®] TL IM parece ser por lo tanto el biocatalizador que produce los peores resultados desde un punto de vista técnico, ya que para conseguir resultados semejantes al del resto de biocatalizadores (~93% de conversión tras una hora, 98.6% de conversión final) requirió el doble de cantidad de biocatalizador, presentando fenómenos de desactivación térmica a 80 °C.

4.1.2.3. Estudio de la reutilización de los biocatalizadores.

Hasta ahora sólo se ha llevado a cabo la optimización de las principales variables necesarias para obtener la mezcla de ésteres del espermaceti con buenos rendimientos temporales y de conversión. Sin embargo, el estudio de la síntesis bajo condiciones de presión reducida y de la influencia de la concentración de biocatalizador y la temperatura del medio se ha basado en efectuar reacciones únicas, utilizando en cada una de ellas una fracción nueva de lipasa inmovilizada. Así pues, aún no se ha tenido en cuenta un factor tanto o más importante desde un punto de vista económico que los anteriores: la estabilidad operacional del catalizador enzimático y su posible reutilización. Por consiguiente, con el fin de establecer si los biocatalizadores comerciales son capaces de mantener su actividad en la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas a lo largo de varios ciclos de operación, se llevó a cabo una serie de ensayos de una hora de duración, en el que el mismo derivado inmovilizado era recuperado tras su uso y utilizado de nuevo hasta un máximo de 15 veces.

Según se describe en la Apartado 3.2.3.2, al final de cada uno de los ensayos, se recuperaba el producto y el catalizador enzimático era lavado con acetona, filtrado, dejado secar al aire y pesado con el fin de determinar la cantidad de derivado inmovilizado recuperada tras cada ensayo. Comparando la masa de biocatalizador utilizada en el primer ensayo y la recuperada del último (Tabla 4.4), se pueden apreciar ligeras diferencias entre ambos valores, que podrían tener su origen en la pérdida de la humedad contenida en el propio derivado inmovilizado (que suele ser mínima) o en el propio proceso de recuperación del biocatalizador entre los ciclos de reacción. En este sentido, desde un punto de vista industrial dicho post-tratamiento resultaría totalmente innecesario siempre y cuando no se cambie el producto sintetizado dentro del reactor, de forma que la eliminación de las etapas de

lavado y secado permitiría pues reducir costes de operación, tiempo de proceso y posibles pérdidas de biocatalizador.

Tabla 4.4- Masa de derivado inmovilizado inicial y recuperada tras el último ensayo de reutilización de los biocatalizadores comerciales bajo condiciones de operación óptimas.

Biocatalizador	Masa inicial (g)	Masa recuperada (g)	Pérdida de biocatalizador (%)
CalB immo Plus	0.5003	0.4077	18.5
Novozym [®] 435	0.5001	0.4863	2.8
Lipozyme [®] RM IM	0.5002	0.5084	nada
Lipozyme [®] TL IM	1.0004	0.9044	9.6

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados para la 1^a, 5^a, 10^a y 15^a utilización de CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM, en la que es evidente que, a pesar de las pérdidas de masa de biocatalizador sufridas durante los usos consecutivos, ninguno de los derivados comerciales muestra una pérdida de actividad significativa a lo largo de la serie experimental. Los valores de conversión alcanzados en cada una de las reutilizaciones se pueden consultar en el Anexo III.

Puesto que durante estos ensayos no se detectó un daño mecánico importante del soporte de inmovilización debido a la agitación, el conjunto de estos resultados apunta a que los biocatalizadores comerciales seleccionados podrán ser reutilizados a largo plazo durante la síntesis de espermaceti a escala industrial.

Uses		Cor	versión (%)	
USOS	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
1°	96.32	96.32	96.12	93.55
5°	95.96	96.02	95.81	94.41
10°	95.74	95.53	95.39	94.19
15°	95.39	94.98	95.71	93.86

Tabla 4.5- Conversión alcanzada tras 60 min bajo condiciones de operación óptimas durante la reutilización de los biocatalizadores comerciales.

4.2. Inmovilización de Lipozyme® CALB L.

A pesar de que los biocatalizadores comercializados actualmente ofrecen buenos resultados en cuanto a conversión, tiempo de operación y capacidad para ser utilizados en diversos procesos, resulta de gran importancia estudiar las variables (tipo de enzima y soporte, método de inmovilización, etc.) que hacen que un biocatalizador presente una elevada actividad y estabilidad, ya que este trabajo, llevado a cabo mayoritariamente a nivel académico, es la base del desarrollo de nuevas generaciones de catalizadores enzimáticos económicamente más rentables y optimizados para aplicaciones.

Es por ello que, a continuación, se propone el desarrollo de diversos biocatalizadores a partir de la disolución comercial Lipozyme[®] CALB L, así como el estudio de la síntesis de espermaceti teniendo en cuenta la influencia de las principales características de dichos derivados. Se ha de tener en cuenta además que, en el caso concreto de la síntesis de los ésteres del espermaceti, el estudio del proceso con la enzima libre en un medio sin disolventes sería prácticamente inviable, debido no sólo al alto punto de fusión e hidrofobicidad de los reactivos, sino también a la presencia de elevadas cantidades de agua, glicerol y sorbitol en la disolución de lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) de Novozymes, que darían lugar a reacciones químicas distintas a las deseadas.

4.2.1. Selección del activador para la inmovilización por adsorción.

La adsorción física de enzimas es probablemente uno de los métodos de inmovilización más sencillos y económicos. En el caso de las lipasas, el proceso de adsorción sobre una superficie hidrófoba suele ocurrir de forma más espontánea que con el resto de enzimas, y en algunos casos supone una mejora de su actividad catalítica, lo que podría deberse a que este tipo de soportes fomenta que el centro activo de la lipasa se encuentre en su configuración abierta [138,200].

En trabajos previos, el Grupo de Investigación "Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana" ha realizado la optimización del proceso de inmovilización por adsorción de Lipozyme[®] CALB L sobre la resina de carácter hidrófilo Lewatit[®] MonoPlus MP 64. Dichos estudios pusieron de manifiesto que, lógicamente, el proceso de inmovilización era favorecido cuando se realizaba una activación previa del soporte con sustancias que propiciaran un entorno apolar, tales como el ácido oleico y el ácido ricinoleico [201,202]. No obstante, algunos autores apuntan a que a la hora de adsorber lipasas sobre soportes de naturaleza hidrófoba, como son los escogidos para la realización de esta Tesis Doctoral, resulta más conveniente llevar a cabo el proceso de activación con un compuesto polar. De este modo, en la bibliografía se pueden encontrar múltiples estudios en los que se hace uso de etanol como activador de la adsorción de lipasas, ya que éste permitiría mejorar la permeabilidad del soporte a las disoluciones acuosas en las que se encuentra la

enzima a inmovilizar, de forma que se facilite la difusión de la lipasa por los poros del soporte [203–205].

El efecto de la utilización de etanol como activador de la inmovilización se evaluó mediante una serie de ensayos preliminares con los soportes Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH (a partir de ahora, sólo denominado Lewatit) y AmberliteTM XADTM 1180 (Amberlite de aquí en adelante). En ellos, se realizaron tres inmovilizaciones siguiendo el protocolo optimizado en trabajos anteriores para el soporte Lewatit[®] MonoPlus MP 64, cambiando el proceso de activación con un ácido graso por: un lavado con agua destilada, una activación con una disolución de etanol en agua al 10% (v/v) y una activación con etanol puro únicamente.

De los resultados del análisis de proteínas realizado a la disolución inicial de Lipozyme[®] CALB L, al sobrenadante y a los lavados de la inmovilización, se constató que el uso de etanol, independientemente de su concentración no suponía una mejora significativa durante la adsorción de CalB sobre Amberlite con respecto al lavado con agua, consiguiéndose en los tres casos rendimientos de inmovilización del orden del 70% y una carga enzimática superior a 100 mg_p/g (miligramos de proteína por gramo de biocatalizador seco), tal y como se puede consultar en el Anexo IV.

Sin embargo, en el caso de la inmovilización de CalB sobre Lewatit, la utilización de etanol sí supuso una evidente mejora de los resultados, observándose que para los dos procesos con etanol el rendimiento había aumentado al 60% frente al 45% obtenido al no usarlo, mientras que en lo que respecta a la carga de lipasa en el biocatalizador, ésta aumentó en más de 30 mg_p/g con respecto al derivado inmovilizado donde sólo se había lavado el soporte con agua (~40 mg_p/g). Asimismo, no se detectaron diferencias relevantes entre los resultados de las inmovilizaciones realizadas usando alcohol etílico puro o diluido, por lo que se escogió utilizar para la elaboración de todos los derivados inmovilizados una activación con una disolución al 10% (v/v) de etanol, tal y como se ha descrito en el Apartado 3.2.1.1.

4.2.2. Estudio de los resultados de la inmovilización.

Puesto que para la realización de esta Tesis Doctoral se ha utilizado el mismo preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica*, así como el mismo protocolo de inmovilización para la elaboración de los biocatalizadores (a excepción del caso de la resina epóxida ECR 8285 M), las diferencias entre los resultados obtenidos para los derivados inmovilizados por adsorción física deben radicar esencialmente en la naturaleza y características del soporte utilizado.

En la Tabla 4.6 se recogen los resultados globales de las diferentes inmovilizaciones, tanto por adsorción física como por enlace covalente, de lipasa B de *Candida antarctica*. Los valores promedio de los análisis de proteína por el método de Lowry para cada uno de los biocatalizadores se pueden consultar en el Anexo IV.

En primer lugar, y de forma general, cabe destacar que en todos los casos la cantidad de derivado seco recuperado es consecuente con los valores que cabría esperar teniendo en cuenta la humedad inicial del soporte (Tabla 3.3 de Materiales y métodos), por lo que se puede afirmar que el proceso de inmovilización empleado, ya sea por adsorción física o por enlace covalente, permite mantener la integridad de la resina y recuperar la totalidad del biocatalizador producido, aunque éste muestre características diferentes según el soporte utilizado.

Soporte	Lotes para una inmovilización	Proteína a inmovilizar (mg)	Biocatalizador seco recuperado (g)	Rendimiento de inmovilización (%)	Carga enzimática (mg _p /g)
Lewatit	3 x 5 g	1044.8 ± 69.1	7.18 ± 0.34	49.6 ± 4.3	71.8 ± 3.2
Amberlite	2 x 5 g	717.2 ± 14.6	4.47 ± 0.21	71.9 ± 1.1	115.9 ± 7.0
ECR 1090 M	2 x 5 g	669.3 ± 47.5	3.95 ± 0.02	72.5 ± 3.1	122.9 ± 8.1
ECR 8806 M	2 x 5 g	614.4 ± 6.7	5.06 ± 0.05	69.4 ± 2.0	84.2 ± 2.1
ECR 8285 M	2 x 5 g	604.3 ± 10.4	3.37 ± 0.08	69.3 ± 2.5	124.5 ± 5.0

Tabla 4.6- Resultados globales de las inmovilizaciones de Lipozyme[®] *CALB L sobre los diferentes soportes.*

Centrándonos únicamente en los resultados conseguidos para Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M, los tres soportes para adsorción que coinciden no sólo en la composición principal de su matriz, el poliestireno, sino también en que poseen diámetros de partícula similares (Anexo I), se puede observar que es Lewatit el que presenta los peores resultados, ya sea en rendimiento de la inmovilización como en carga enzimática conseguida, mientras que Amberlite consigue fijar 1.6 veces más proteína y ECR 1090 M 1.7 veces más, aumentando el rendimiento en más de 20 unidades porcentuales. Teniendo en cuenta el área superficial de los soportes, este parámetro por sí sólo no permitiría explicar dichos resultados, puesto que tanto Lewatit como ECR 1090 M presentan valores similares de área (>750 m²/g en ambos casos) y grandes diferencias en los resultados de la inmovilización, mientras que el área ofrecida por Amberlite, cuyo valor nominal es mucho inferior ($\geq 450 \text{ m}^2/\text{g}$), parece más que suficiente para albergar cantidades de CalB del mismo orden que ECR 1090 M. Estos resultados para los tres soportes de poliestireno podrían explicarse principalmente por el tamaño de poro ofrecido por el entrecruzamiento del polímero (Tabla 3.3 de Materiales y métodos). En este sentido, Lewatit es la resina que presenta los poros más pequeños, cuyo rango va de los 50 a los 100 Å, pero una gran área superficial, por lo que es lógico pensar que dicho soporte tiene una considerable cantidad de poros, mientras que Amberlite y ECR 1090 M poseen poros más grandes, de 300 a 400 Å y de 900 a 1100 Å respectivamente, y probablemente menos abundantes. De este modo, los resultados de la inmovilización apuntan a que tamaños de poro del orden de los de Lewatit impiden la entrada de CalB dentro de ellos, de forma que no se puede aprovechar toda la superficie disponible en el soporte y la mayor parte de la enzima se debe encontrar en la superficie del biocatalizador. Esta hipótesis se ve reafirmada si se tiene en cuenta que CalB es una enzima globular de unos 30x40x50 Å [143], valores demasiado próximos al tamaño de poro proporcionado por Lewatit, y que al aumentar el valor de dicho parámetro, como en el caso de los otros dos soportes de poliestireno, se consiguen mejores cargas enzimáticas y rendimientos. Asimismo, se observa que el aumento del tamaño de poro de Amberlite a ECR 1090 M mejora los resultados de la inmovilización de una manera muy sucinta, hallazgo similar al reflejado en un estudio llevado a cabo por Chen et al. [206], en el que se observó que CalB presenta una gran afinidad por las matrices de poliestireno y que un aumento del tamaño de poro de 300 a 1000 Å no conllevaba un rendimiento mayor durante la inmovilización de dicha lipasa. De esta forma, se puede establecer que Amberlite posee unas características lo suficientemente buenas en cuanto a área superficial y tamaño de poro para permitir la adsorción física de CalB así como, probablemente para permitir la movilidad conformacional necesaria para su actividad catalítica cuando se halla dentro del soporte. Unos valores mayores de dichos parámetros (ECR 1090 M), no redundan de manera significativa en una mejora a la hora de adsorber CalB sobre las matrices de poliestireno con el protocolo inmovilización utilizado.

En lo que concierne al cuarto biocatalizador producido por adsorción física, el de ECR 8806 M, se puede constatar que presenta un rendimiento de inmovilización y una carga enzimática inferiores a los de Amberlite, lo que puede estar condicionado a que posee un área superficial mínima de 80 m²/g, un valor mucho menor que Amberlite a pesar de que presenta un tamaño de poro mayor. Además, ECR 8806 M está compuesto por un polímero diferente, el metacrilato de octadecilo, que supuestamente debería presentar un carácter ligeramente más polar que el del poliestireno, lo que podría también dificultar la adsorción. No obstante, teniendo en cuenta que la inmovilización se lleva a cabo en medio acuoso y la elevada hidrofobicidad de ambos polímeros, el efecto de la composición de matriz resulta de menor relevancia frente a las grandes diferencias en el valor de área superficial a la hora de explicar los resultados obtenidos.

Aun así, los resultados de la inmovilización para cualquiera de las cuatro resinas escogidas para llevar a cabo la adsorción de la enzima contenida en Lipozyme[®] CALB L, mejoran con creces los obtenidos en trabajos anteriores con Lewatit[®] MonoPlus MP 64, en los que se obtenía un rendimiento del proceso próximo al 40%, lo que pone de manifiesto el claro efecto desfavorable de utilizar resinas de carácter polar para la inmovilización de lipasas, incluso aunque el soporte haya sido activado previamente con compuestos de naturaleza hidrófoba [195]. Los valores de carga enzimática conseguidos son además del mismo orden que los publicados por otros autores para soportes de naturaleza semejante (Tabla 4.7), aunque se ha de tener en cuenta que dichos resultados dependen en gran medida de la cantidad de proteína ofrecida al soporte inicialmente y del protocolo de inmovilización utilizado, además de las características de la resina.

la bibliografía.
encontradas en
CalB
movilizaciones de
Resultados de in
Tabla 4.7- 1

				,)			
Método	Soporte	Área superficial (m ² /g)	Tamaño de poro (Å)	Diámetro de partícula (µm)	Carga enzimática (mg _p /g)	Actividad	Referencia
adsorción	poliestireno con grupos amino (Lewatit [®] MonoPlus MP 64)			590 ± 50	35.2		[195]
adsorción	polipropileno (Accurel®)	80 - 100	50 - 500		220	13.1 PLU/g ^a	[207]
adsorción	poliestireno (Amberlite TM XAD TM 1180)	550	400 - 450	1	200	8.7 PLU/g ^a	[207]
adsorción	poliestireno (Purolite [®] AP 1090)	20 - 25	1600-2300		82	4.9 PLU/g ^a	[207]
adsorción	poliestireno/DVB (Amberchrom TM CG 300S)	700	300	35	84	I	[206]
adsorción	metacrilato de metilo (Amberchrom TM CG 71M)	500	250	75	54	1	[208]
covalente	nanopartículas de sílice (SBA-15) funcionalizadas con grupos epóxidos		80	-	36	1340 U/mg ^b	[157]
covalente	poliestireno/DVB con grupos amino (Purolite [®] A109) funcionalizado con grupos epóxido	1	-	425 - 1000	2.8	12 U/mg ^b	[209]
covalente	polimetacrilato (Sepabeads [®] EC-EP) funcionalizado con grupos epóxido	1	1	150 - 300	117.9	400 U/g ^c	[210]
n :g/U° :gm/U ^d 3/UJf	y: unidades de laurato de propilo : unidades de p-nitrofenil butirato nidades de laurato de poliglicerilo						

- 109 -

Por otra parte, volviendo a la Tabla 4.6 se observa que los resultados obtenidos por inmovilización covalente sobre ECR 8285 M, son similares a los de las inmovilizaciones por adsorción, lo que lleva a pensar que dicha resina presenta una buena reactividad de sus grupos epóxidos con los residuos nucleófilos presentes en la superficie de CalB, y que el proceso de difusión de la enzima en el entorno del soporte se ha visto facilitado por el carácter moderadamente hidrófobo del núcleo de la matriz polimérica. En la Tabla 4.7 se puede comprobar que el resultado de la inmovilización es similar al encontrado en la bibliografía para una resina comercial de matriz parecida a la utilizada, siendo quizá el número de grupos epóxidos disponibles una de las principales causas de diferencia entre los biocatalizadores elaborados por enlace covalente.

4.3. Obtención de espermaceti biotecnológico con derivados inmovilizados de Lipozyme® CALB L.

4.3.1. Estudios previos en un reactor abierto.

4.3.1.1. Comprobación de la actividad de los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio.

Con el fin de evaluar si los derivados obtenidos por inmovilización de la lipasa contenida en Lipozyme[®] CALB L eran adecuados para la síntesis del conjunto de ésteres que componen el blanco de ballena, se llevó a cabo la síntesis "solvent-free" de miristato de cetilo a presión atmosférica, tal y como se describe en el Apartado 3.2.3.1.

A raíz de estos experimentos, cuyos resultados se pueden consultar en el Anexo V, se obtuvieron curvas parecidas a la que se muestra en la Figura 4.11, que se corresponde al ensayo para ECR 8806 M, en la que se puede observar el drástico aumento de la conversión con el transcurso del tiempo. Para todos los biocatalizadores, la conversión alcanzada tras una hora de reacción fue superior al 85%, habiéndose transformado entre el 96 y el 97.5% de los reactantes a las tres horas, lo que supone un número ácido final entre 3 y 5 mg KOH/g.



Figura 4.11- Síntesis de miristato de cetilo en un reactor abierto utilizando 1 g de ECR 8806 M (20 g, 1:1, 60 °C, 350 rpm).

Por lo tanto, la carga de lipasa y las características de los soportes escogidos para la preparación de estos derivados inmovilizados permite llevar a cabo la obtención de miristato de cetilo alcanzando conversiones similares a las conseguidas con biocatalizadores comerciales para un tiempo dado, ya que la síntesis transcurre a una buena velocidad. En

consecuencia, cabe esperar que los biocatalizadores elaborados en el laboratorio sean capaces de catalizar la síntesis del resto de los ésteres del espermaceti en un medio libre de disolventes.

4.3.1.2. Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción.

Una vez comprobada la actividad de los biocatalizadores elaborados a partir de Lipozyme[®] CALB L, se procedió a evaluar si la lipasa contenida en ellos era liberada al medio de reacción siguiendo la misma metodología utilizada con los biocatalizadores comerciales, de lo que se obtuvieron los datos representados en la Figura 4.12.

Al igual que en los resultados expuestos en el Apartado 4.1.1.2, también se pueden apreciar ligeras oscilaciones del valor del número ácido a lo largo del tiempo, aunque tras una hora de desorción y seis horas de ensayo se detectó una disminución del número ácido de entre dos y cuatro unidades en todos los casos (Anexo V). Dicha variación es tan pequeña que no permite afirmar con certeza que no es debida al propio error experimental de la determinación o a la influencia de la humedad ambiental en el medio de reacción. No obstante, si se considerara que la disminución del número ácido ha sido provocada por la presencia de lipasa libre en el medio de reacción, este fenómeno podría ser atribuible a que no se han realizado los suficientes lavados del biocatalizador con tampón tras el proceso de inmovilización, de forma que no se ha conseguido retirar con eficacia la lipasa que no ha sido adsorbida en el soporte y ésta podría ser susceptible de pasar al medio de reacción, quedando sobre el biocatalizador la que realmente ha sido inmovilizada. Esta hipótesis parece corroborarse si observamos los resultados pormenorizados de las inmovilizaciones incluidas en el Anexo IV, durante los que se detectó, para todos los biocatalizadores, la presencia de enzima libre en el segundo lavado efectuado. Aun así, en el caso de aceptar la existencia de fenómenos de desorción de la lipasa inmovilizada, ésta sería, desde luego, mínima.



Figura 4.12- Estudio de la desorción de la lipasa contenida en los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm).
4.3.2. Optimización del proceso de síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones.

4.3.2.1. Influencia de la concentración de biocatalizador.

Dada la importancia, desde un punto de vista técnico y económico, de la cantidad de derivado inmovilizado empleado en los procesos de síntesis biocatalítica, la optimización de la síntesis de blanco de ballena con los derivados de Lipozyme[®] CALB L en el reactor de altas prestaciones Parr 5101 comenzó con el estudio de la influencia de dicha cantidad durante la esterificación, por separado, de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico con el alcohol cetílico.

Para ello, se han realizado diversos experimentos bajo condiciones de operación exactamente iguales a las empleadas durante los ensayos con CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM, las cuales se encuentran reflejadas en el Apartado 3.2.3.2. De este modo, para llevar a cabo esta serie experimental, se ha empleado cantidades de biocatalizador comprendidas entre 0.125 y 1 g, excepto para Lewatit, con el que también se llevó a cabo la síntesis con 2 g. Esto supone que los ensayos han sido realizados con concentraciones de entre un 0.625% y un 5% en peso (o 10% para Lewatit) referido a los sustratos. Los resultados obtenidos durante esta serie experimental se pueden consultar, tanto en términos de número ácido como de conversión, en el Anexo VI.

En el caso de los biocatalizadores elaborados por adsorción física, Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M y ECR 8806 M, el grado de avance de la reacción con el tiempo se ha reflejado, también, en las Figuras 4.13 a 4.16 respectivamente. En ellas, se puede ver que dichos derivados permiten efectuar con éxito la síntesis los cuatro ésteres del espermaceti. Además, el proceso comienza con un rápido aumento de la conversión, tras el cual la esterificación alcanza su equilibrio en torno al 97 – 99% de conversión a diferentes intervalos de tiempo según el ensayo, pero siempre dentro de los 360 min, momento en el que se da por concluida la reacción independientemente de la cantidad de biocatalizador utilizada.



Figura 4.13- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.14- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.15- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.16- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En las anteriores figuras, resulta evidente que, al igual que con los preparados comerciales, el aumento de la concentración de biocatalizador en el medio de reacción propicia una mayor velocidad de síntesis. Sin embargo, la superposición de las curvas obtenidas de los ensayos realizados con las dos cantidades de derivado inmovilizado más elevadas hace evidente de forma visual que dicha mejora de la cinética del proceso no es proporcional a la cantidad de biocatalizador utilizada, ya que el medio de reacción parece "saturado" desde un punto de vista catalítico. Por ejemplo, observando la conversión alcanzada a los 15 min de ensayo utilizando el derivado de Lewatit (Tabla 4.8), se ve que el valor de ésta se multiplicó entre 2.1 y 2.9 veces según el éster al doblar la cantidad de biocatalizador de 0.125 a 0.25 g, mientras que al incrementar la masa de nuevo a 0.5 g sí parece duplicarse la conversión. No obstante, al trabajar con 1 y 2 g de biocatalizador, las conversiones se incrementaron, respectivamente, en un factor de ~1.5 y ~1, momento en que se ven las gráficas superpuestas.

Cantidad de – biocatalizador	Conversión (%)					
	Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo		
0.125 g	9.67	8.63	8.62	10.7		
0.25 g	25.9	23.71	25.34	22.69		
0.5 g	51.98	52.58	50.83	47.21		
1 g	82.08	74.9	77.46	74.13		
2 g	81.52	80.69	81.49	80.09		

Tabla 4.8- Conversión alcanzada a los 15 min de reacción durante la síntesis de los ésteres cetílicos por separado empleando Lewatit.

Puesto que la fuente de enzima de todos los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio es la misma, la lipasa B de *Candida antarctica* contenida en Lipozyme[®] CALB L, las diferencias en su comportamiento durante la síntesis de los ésteres cetílicos deben radicar en las distintas características de los soportes empleados, así como en el propio contenido en enzima inmovilizada. Este doble efecto queda claramente reflejado en la Figura 4.17, en la que se ha representado los primeros 180 min de la síntesis de estearato de cetilo con 0.125 g de los biocatalizadores elaborados con las resinas de poliestireno Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M, cuyo tamaño de partícula es similar (Anexo I). En ella se observa que, para una misma cantidad de derivado inmovilizado en el medio de reacción, la velocidad de síntesis menor corresponde al ensayo realizado con Lewatit, lo que se puede atribuir a que dicho biocatalizador es el que presenta un menor contenido en lipasa inmovilizada (71.8 mg_p/g) y el tamaño de poro más pequeño de entre todos los biocatalizadores (50 – 100 Å). Seguidamente se halla la curva obtenida con Amberlite, que contiene 1.6 veces más lipasa que Lewatit y un mayor tamaño de poro (Tabla 3.3 de Materiales y métodos), siendo finalmente ECR 1090 M el biocatalizador que produce mayores velocidades de síntesis. A diferencia del caso de

Lewatit, parece que el factor con mayor influencia en los resultados obtenidos para estos dos derivados inmovilizados no es tanto la cantidad de lipasa inmovilizada (ya que mientras que ECR 1090 M posee una carga enzimática de 122.9 mg_p/g, la carga de Amberlite es de 115.9 mg_p/g, un valor ligeramente inferior), sino el tamaño de poro, de 900 – 1100 Å para ECR 1090 M frente a 300 – 400 Å para Amberlite, lo que permite una mejor difusión de los sustratos y el producto de mayor peso molecular y explica los mejores resultados de ECR 1090 M.

Cabe destacar que de forma general se detectan tendencias parecidas al comparar la síntesis del resto de ésteres cetílicos con estos tres derivados de CalB, aunque resultan menos evidentes cuando se trabaja con cantidades mayores de éstos debido a la superposición de las curvas de conversión por el "exceso" de enzima.



Figura 4.17- Síntesis de estearato de cetilo en el reactor de altas prestaciones utilizando 0.125 g de los biocatalizadores basados en matrices de poliestireno:
Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

Por otra parte, en la Figura 4.18 se compara a modo de ejemplo la variación de la conversión de las muestras tomadas durante 180 min en la síntesis de palmitato de cetilo con 0.125 g de derivado inmovilizado en ECR 8806 M y en Amberlite, resina que por tamaño de poro resulta la más parecida a éste (Anexo I). Como se puede ver, el biocatalizador de metacrilato presenta una mayor velocidad de reacción que Amberlite bajo las mismas condiciones de reacción, pero estos resultados no pueden ser atribuibles a los valores carga enzimática de ambos biocatalizadores, puesto que el contenido en lipasa es mucho mayor en Amberlite (115.9 mg_p/g) que en ECR 8806 M (84.2 mg_p/g). Asimismo, el valor de área superficial disponible en el soporte también parece en disonancia con las observaciones experimentales, ya que ésta es, como mínimo, entre 4.6 y 5.6 veces más pequeña que para Amberlite. En contraposición a los datos discutidos previamente para las resinas de poliestireno, aunque la diferencia de tamaño de poro no parece lo suficientemente grande como para poder explicar de forma contundente dichos resultados, la principal

explicación para el comportamiento observado en la Figura 4.18 parece residir en la combinación del efecto del tamaño de poro de ECR 8806 M (513 Å para el lote utilizado, frente a los 300 – 400 Å de Amberlite) y de la naturaleza química del polímero que constituye el soporte, de manera que aun siendo ambos de carácter hidrófobo, el metacrilato de octadecilo de ECR 8806 M permitiría una mejor difusión de sustratos y productos durante la síntesis. Estas observaciones son además similares a las que se obtienen de la comparación de los datos recogidos para los otros ésteres del espermaceti, incluso a mayores cantidades de biocatalizador.



Figura 4.18- Síntesis de palmitato de cetilo en el reactor de altas prestaciones utilizando 0.125 g de los biocatalizadores ECR 8806 M y Amberlite (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En lo que respecta al biocatalizador obtenido por enlace covalente, el de ECR 8285 M, en la Figura 4.19 se aprecia que de forma general el grado de avance de la esterificación con el tiempo de ensayo se produce de forma no lineal, de modo que inicialmente se produce un gran aumento de la conversión tras lo cual se estabiliza, momento en que se ha alcanzado el equilibrio de la reacción.

Al igual que con el resto de derivados inmovilizados, el aumento de la concentración de biocatalizador supone un incremento de la velocidad de reacción que no es proporcional a la cantidad de derivado presente en el medio de reacción. Sin embargo, en esta serie experimental se aprecia una distorsión de la curva que representa el ensayo para la concentración más baja de ECR 8285 M, y que es especialmente acusada en el caso del laurato de cetilo mientras que al aumentar la cadena de carbono parece mitigarse. En anteriores trabajos de este Grupo de Investigación, también se observaron comportamientos anómalos durante la síntesis de ricinoleato de cetilo empleando un derivado inmovilizado que no había sido secado previamente a su uso, y que desaparecieron tras someterlo a un lavado con acetona para eliminar los restos de humedad presentes en el biocatalizador [195,211]. En consecuencia, todos los protocolos de inmovilización seguidos para el desarrollo de esta Tesis

Doctoral incluyen una etapa final de secado de los biocatalizadores (Apartado 3.2.1), que en el caso de no haberse completado adecuadamente para este derivado inmovilizado hubiese dado lugar a un comportamiento irregular en todos los experimentos llevados a cabo con ECR 8285 M, independientemente de la cantidad de éste en el medio o del éster sintetizado. Asimismo, parece poco verosímil explicar estos resultados por una acumulación del agua generada durante la esterificación en el medio de reacción, ya que esta debería ser mucho mayor en los ensayos a mayor concentración de biocatalizador y se ha de recordar que la síntesis se lleva a cabo bajo condiciones de atmósfera controlada, por lo que el agua es eliminada de la mezcla reaccionante de forma continua.

Por el contrario, se podría pensar que debido a la aplicación de vacío, no existe la cantidad de agua necesaria para que CalB (cuya estructura nativa ha sido alterada durante la inmovilización) manifieste su actividad catalítica, estudio previamente realizado por el Grupo de Investigación durante el proceso de optimización de la síntesis de estólidos del ácido ricinoleico [165]. En él, se constató que a las 48 h de reacción a presión reducida y con una corriente de aire seco, el medio de reacción era completamente anhidro y la actividad de CalB era menor, pero, teniendo en cuenta la duración de los ensayos realizados con ECR 8285 M y que el comportamiento extraño del biocatalizador sólo se presenta para pocos ensayos, esta explicación tampoco resulta adecuada.

Así pues, de la observación más detallada de la gráfica correspondiente a la síntesis de laurato de cetilo (Figura 4.19 a) con 0.125 g de biocatalizador, se ve que ésta comienza con pequeños aumentos de la conversión a lo largo de la primera hora de ensayo, para luego aumentar drásticamente en sólo una hora más, tras lo cual se alcanza el equilibrio de la reacción. Este curioso comportamiento podría apuntar a que la presencia de una gran cantidad de ácido láurico en el medio de reacción, ya sea porque lo hace más ligeramente más polar (siempre considerando que es un ácido graso de cadena larga) o porque modifica su pH, es inadecuada para que CalB enlazada covalentemente a la resina epóxida pueda catalizar con gran rapidez la esterificación, de forma que sólo cuando se ha disminuido la concentración de ácido por debajo de un cierto límite y se ha sustituido por su respectivo éster, de cadena mucho más larga, la enzima puede manifestar toda su actividad. Esta explicación respondería pues al hecho de que sólo se observe para el ensayo con menor cantidad de biocatalizador y se mitigue para los ácidos mirístico, palmítico y esteárico, de mayor peso molecular.



Figura 4.19- Síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En la Tabla 4.9 se recoge la velocidad de reacción a los 15 min de ensayo calculada con la cantidad máxima estudiada de cada uno de los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L, de la que se concluye que por lo general el valor de este parámetro disminuye cuanto mayor es la longitud del ácido graso, aunque no parece existir una relación evidente entre esta disminución y las propiedades de los soportes. Asimismo, cabe destacar que las velocidades de reacción obtenidas para estos biocatalizadores son muy parecidas a las de los derivados comerciales y de nuevo se puede afirmar que la contribución de la concentración y propiedades de los derivados en el laboratorio a la velocidad del proceso es mucho mayor que el efecto del número de carbonos que constituye la cadena de los compuestos estudiados.

		X 7 1					
Compuesto	Velocidad de reacción (ΔN.A./min)						
sintetizado	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M		
Laurato de cetilo	6.83	7.40	7.13	7.48	7.08		
Miristato de cetilo	6.55	6.93	6.82	7.04	7.18		
Palmitato de cetilo	6.85	6.46	6.53	6.94	6.98		
Estearato de cetilo	6.01	5.69	6.31	6.31	6.71		
Disminución de velocidad entre laurato y estearato (%)	12.03	23.11	11.51	15.67	5.29		

Tabla 4.9- Velocidad de reacción para un tiempo de operación de 15 min, en los ensayos realizados a mayor cantidad de biocatalizador (2 g de Lewatit; 1 g de Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M).

A la luz de los resultados descritos en este apartado, se ha escogido 0.5 g como cantidad óptima de Lewatit y Amberlite, lo que supone una concentración del 2.5% (w/w), mientras que para el resto de derivados inmovilizados, la cantidad seleccionada es 0.25 g (1.25% de derivado en el medio) ya que probablemente, más allá de estas cantidades el gasto económico producido al aumentar la cantidad de derivado inmovilizado en el medio de reacción no se vería justificado por el ligero incremento producido en la velocidad de reacción.

4.3.2.2. Influencia de la temperatura de operación.

La evaluación del efecto de la temperatura se llevó a cabo, al igual que para los biocatalizadores comerciales, utilizando la concentración óptima de derivado determinada en el apartado anterior en ensayos a 60, 70 y 80 °C. Los resultados de esta serie experimental se hallan en el Anexo VI, mientras que en la Figura 4.20 se encuentran representados gráficamente los correspondientes a los primeros 120 min de reacción, resultando evidente que todos los catalizadores enzimáticos preparados en el laboratorio son capaces de llevar a cabo la síntesis simultánea de los ésteres del espermaceti con éxito.



Figura 4.20- Síntesis de espermaceti a varias temperaturas utilizando 0.5 g de Lewatit (a) y Amberlite (b) y 0.25 g de ECR 1090 M (c), ECR 8806 M (d) y ECR 8285 M (e) en el reactor de altas prestaciones (20 g, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

- 124 -

Asimismo, cabe destacar que el aumento de la temperatura favorece el proceso de esterificación para todos los biocatalizadores preparados, que, aparentemente, no se ven afectados por fenómenos de desactivación térmica, independientemente de si han sido elaborados por adsorción o enlace covalente. De este modo, por ejemplo para Amberlite, el aumento de temperatura de 60 a 70 °C supone un incremento del 10.5% en la conversión a los 15 min, y del 12.4% entre 70 y 80 °C. Como se ha comentado en la Sección 4.1.2.2, estas observaciones se deben al efecto de la temperatura sobre la constante cinética, sobre la evaporación del agua generada durante la síntesis y sobre la viscosidad del medio de reacción, lo que explicaría que las consecuencias positivas de dicho parámetro sean especialmente evidentes para el biocatalizador de menor tamaño de poro: Lewatit.

A pesar de que se han descrito usos de CalB inmovilizada a temperaturas superiores [212], los resultados obtenidos se consideraron suficientemente satisfactorios y no se estudiaron temperaturas superiores a 80 °C. Consecuentemente, se seleccionó 70 °C como temperatura óptima para la síntesis de espermaceti con cada uno de los biocatalizadores, puesto que representa una solución de compromiso entre los requerimientos de una buena velocidad de reacción y una reducción sustancial del tiempo de acondicionamiento de los sustratos.

4.3.2.3. Estudio de la estabilidad al almacenamiento.

Desde un punto de vista industrial, es conveniente disponer de un stock de derivado inmovilizado ya preparado para un posible uso futuro, de modo que no se requiera elaborarlo en el momento previo a su utilización. En consecuencia, cuando se formula un nuevo biocatalizador resulta muy recomendable evaluar su estabilidad cuando éste es almacenado bajo unas condiciones adecuadas, de forma que se pueda determinar si pierde actividad a lo largo del tiempo. Además, de acuerdo con la Federación Europea de Biotecnología, este estudio resulta de gran interés para llevar a cabo una caracterización completa de los catalizadores enzimáticos y para poder obtener resultados reproducibles y fiables cuando se trabaja con ellos [213].

Para la realización de este tipo de ensayos, se almacenó una fracción de cada uno de los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio, proveniente de una inmovilización concreta, a 7 °C y en presencia de desecante de gel de sílice, utilizándose para la síntesis de miristato de cetilo en el reactor Parr 5101 en el momento de su obtención y a intervalos de tiempo regulares hasta un año después.

Tanto en el Anexo VI como en la Figura 4.21 se pueden consultar los resultados de dichos experimentos, en los que no se puede detectar cambios significativos en la evolución del proceso de esterificación relacionados con el tiempo de almacenamiento de los distintos derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L. Así, resulta evidente que los procesos de inmovilización empleados durante la elaboración de esta Tesis Doctoral permiten obtener biocatalizadores estables en los que se conserva su actividad enzimática durante, al menos, doce meses si son almacenados bajo las condiciones recomendadas.



Figura 4.21- Conversión alcanzada tras 60 min de ensayo en la síntesis de miristato de cetilo utilizando 0.25 g de Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones tras diferentes tiempos de almacenamiento (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

4.3.2.4. Estudio de la reutilización de los biocatalizadores.

Tan necesario es que el catalizador enzimático pueda ser almacenado desde un punto de vista práctico, como que presente una buena estabilidad operacional, ya que en muchos casos, la viabilidad económica de un proceso industrial biocatalítico pasará por que éste pueda ser reutilizado en un número elevado de ciclos. Por consiguiente, se llevó a cabo el estudio de la reutilización de los derivados de Lipozyme[®] CALB L tal y como se describe en el Apartado 3.2.3.2, de forma que el biocatalizador era recuperado tras una hora de reacción bajo condiciones óptimas, lavado con n-hexano, dejado secar al aire y vuelto a usar hasta 15 veces.

En la Figura 4.22 se pueden ver los resultados de dichos experimentos, cuyos valores numéricos se hallan en el Anexo VI. Como se puede constatar, sólo dos de los cinco derivados de CalB consiguen mantener su actividad catalítica durante el número máximo de 15 reutilizaciones: Amberlite y ECR 8806 M. Dichos biocatalizadores presentan tamaños de poro similares pero composiciones diferentes de su soporte, puesto que uno es de poliestireno y el otro un metacrilato respectivamente, lo que pone en evidencia, que en principio, ambos polímeros son adecuados para elaborar soportes de inmovilización con una buena vida útil. Sin embargo, observando los resultados conseguidos con las otras resinas de poliestireno, resulta obvio que es ECR 1090 M la primera en presentar problemas de estabilidad operacional, concretamente a los cuatro usos, tras los cuales se podían observar graves daños físicos de la resina debido a la agitación. ECR 1090 M sólo difiere con Amberlite en el grado de entrecruzamiento del polímero que da lugar a los distintos tamaños de poro, lo que apunta pues a que, independientemente de su composición, se requiere que la estructura y organización del polímero que constituye el soporte le confieran las características mecánicas necesarias para cumplir con su función durante varios ciclos de uso.



Figura 4.22- Conversión alcanzada durante el estudio de la reutilización de los biocatalizadores en la síntesis de espermaceti tras 60 min en el reactor de altas prestaciones bajo condiciones de operación óptimas (20 g, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En el caso de Lewatit, se detectó que el biocatalizador se rompía con facilidad y comenzaba a perder actividad en el sexto uso, a pesar de que su matriz se compone de poliestireno reticulado con un tamaño de poro inferior al de Amberlite. Estas observaciones sólo pueden deberse por lo tanto a que existan diferencias en el agente entrecruzante empleado en la elaboración de las resinas, que en el caso de Amberlite es el divinilbenceno, mientras que para Lewatit no queda especificado por los fabricantes, lo que pone en evidencia que no se debe restar importancia a la composición del soporte empleado. Esta afirmación parece corroborarse al analizar los resultados obtenidos con el biocatalizador obtenido por enlace covalente, ya que aunque posee un tamaño de poro parecido a ECR 8806 M y también está constituida por un metacrilato, la pérdida de actividad ECR 8285 M podría tener su origen en las diferencias de composición que permiten funcionalizar estas dos resinas: la introducción de grupos octadecilo en el caso de ECR 8806 M y de grupos epóxido y butilo en ECR 8285 M.

En la Tabla 4.10 se recogen los valores de la masa de biocatalizador utilizada para el experimento inicial y disponible tras el último. En ella se puede observar que, a pesar del daño sufrido por algunos de los soportes debido a la agitación, es posible recuperar prácticamente todo el biocatalizador. Por lo tanto, se puede concluir que, al igual que para los biocatalizadores comerciales, las pérdidas de biocatalizador se deben mayoritariamente al método escogido para recuperarlos.

Puesto que la variación entre la cantidad usada en el ensayo inicial y la recuperada en el último es inferior al 10% en todos los casos, la pérdida de biocatalizador a lo largo de los distintos usos no permite justificar la disminución de la actividad de los derivados inmovilizados sobre Lewatit, ECR 1090 M y ECR 8285 M. Estas observaciones apuntan a que su baja estabilidad operacional podría estar motivada por la propia naturaleza del soporte, tal y como se ha discutido previamente.

Por el contrario, la pérdida de masa ocurrida entre el primer experimento y el decimoquinto para ECR 8806 M podría ser el origen de la ligera caída en el valor de la conversión observada en la Figura 4.22, un 5.4% del valor inicial. No obstante, cabe destacar que en el caso del otro derivado inmovilizado que ha conseguido completar las 15 utilizaciones continuadas, el de Amberlite, el valor de la conversión tras 60 min de ensayo no se ha visto afectado por la pérdida de catalizador entre los diferentes usos, a pesar de que ésta sea mayor que para ECR 8806 M (un 8.0% frente a un 6.1%, respectivamente). Dicho comportamiento debe tener su origen en la cantidad de derivado empleada para realizar el ensayo, ya que esta es el doble para Amberlite que para ECR 8806 M, lo que podría enmascarar el efecto de la pérdida de biocatalizador a lo largo de los usos.

Biocatalizador	Masa inicial (g)	Masa recuperada (g)	Pérdida de biocatalizador (%)
Lewatit	0.5003	0.4604	8.0
Amberlite	0.5003	0.4774	4.6
ECR 1090 M	0.2502	0.2575	nada
ECR 8806 M	0.2500	0.2347	6.1
ECR 8285 M	0.2504	0.2596	nada

Tabla 4.10- Masa de derivado inmovilizado inicial y recuperada durante la reutilización de los biocatalizadores de Lipozyme[®] CALB L bajo condiciones de operación óptimas.

4.3.2.5. Influencia de la velocidad de agitación.

Conseguir una agitación adecuada del medio de reacción es de gran importancia en las reacciones heterogéneas, pues ésta influye de forma significativa en los fenómenos de transporte de materia y difusión que se dan entre las distintas fases del sistema. Una agitación vigorosa resulta esencial para el transporte de sustratos con baja solubilidad o, como el caso que nos ocupa, viscosos, pero el tipo de agitador, sus dimensiones y su velocidad deben ser controladas para evitar que se ejerza sobre el medio unas fuerzas de cizalla excesivas que den lugar a la abrasión del biocatalizador [102].

Por los anteriores motivos, la influencia de la velocidad de agitación ya había sido estudiada previamente por el Grupo de Investigación en la síntesis de ésteres tales como el ricinoleato de cetilo [211] o el miristato de miristilo [214], demostrándose que 350 rpm favorecía el proceso de síntesis frente a velocidades más bajas y que no se producían daños mecánicos en los biocatalizadores empleados, un derivado de CalB inmovilizada sobre Lewatit[®] MonoPlus MP 64 y Novozym[®] 435, respectivamente. Dichas conclusiones están en consonancia con las realizadas por otros autores durante la obtención de derivados de ácidos grasos mediante lipasas inmovilizadas [131,132,215,216], por lo que la agitación del medio de reacción no fue inicialmente considerada como una de las variables a optimizar para el desarrollo de este trabajo. Sin embargo, en vista de los resultados conseguidos durante el estudio de la estabilidad operacional de los derivados inmovilizados en el laboratorio, se decidió evaluar la posibilidad de llevar a cabo la síntesis de espermaceti, bajo las condiciones óptimas de cantidad de biocatalizador y temperatura, a velocidades inferiores a la que se había utilizado hasta el momento: 150 y 250 rpm.

Durante dicha serie experimental, se obtuvieron los resultados reflejados en la Figura 4.23, que también pueden ser consultados en el correspondiente apartado del Anexo VI. A partir dicha gráfica se puede deducir que, de forma general, la velocidad de síntesis se ve claramente afectada al trabajar a 150 rpm, puesto que tras una hora de reacción el valor de la conversión se halla entre un 76 y un 82% para todos los ensayos, lo que supone entre 15 y 20 unidades porcentuales menos del valor alcanzado al trabajar a 350 rpm para ese mismo tiempo. Así pues, a 150 rpm la etapa controlante del proceso parece ser la transferencia de materia, y éste transcurre a una velocidad tal que se requiere en todos los casos de las seis horas de ensayo para poder alcanzar el valor de conversión final.

En contraposición, en la Figura 4.23 se puede ver que en la mayoría de casos la evolución de la conversión con el tiempo es muy similar a 250 y 350 rpm, estando las curvas representativas de dichos experimentos casi superpuestas. Así, trabajar a 350 rpm generalmente supone una mejora sucinta de la velocidad de reacción si la comparamos con los resultados obtenidos a 250 rpm, y en ambos casos la reacción se puede prácticamente dar por concluida entre las dos y las tres horas de ensayo. Cabe además destacar que aunque estas diferencias son algo más acusadas en el caso de ECR 8285 M, resultan casi imperceptibles tras dos horas de reacción, por lo que con el fin de mantener la integridad física de los derivados inmovilizados, se podría llevar a cabo la síntesis a 250 rpm sin grandes variaciones en los tiempos de operación requeridos para alcanzar una conversión dada.



Figura 4.23- Síntesis de espermaceti a varias velocidades de agitación utilizando 0.5 g de Lewatit (a) y Amberlite (b) y 0.25 g de ECR 1090 M (c), ECR 8806 M (d) y ECR 8285 M (e) en el reactor de altas prestaciones (20 g, 70 °C, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En lo que respecta a la forma del agitador, como ya se ha descrito en el Apartado 3.1.2.3, el reactor Parr 5101 está equipado con una turbina de cuatro palas inclinadas. A diferencia de los agitadores de palas rectas, la configuración seleccionada es una de las recomendadas para mezclas de media o alta viscosidad y proporciona un flujo axial en el medio, lo que facilita la suspensión de sólidos, como son las partículas de biocatalizador. Además, los agitadores de palas inclinadas permiten trabajar a elevadas velocidades con esfuerzos cortantes moderados, por lo que junto con las geometrías tipo hélice, resulta ser el modelo de agitador conveniente para asegurar un buen grado de mezcla intentando preservar en la medida de lo posible la integridad del soporte de inmovilización [217,218].

4.3.2.6. Comparación de la actividad de los derivados inmovilizados.

Una forma de evaluar la influencia que ejerce la inmovilización sobre un determinado soporte en la actividad de la lipasa inmovilizada, es llevar a cabo reacciones comparativas entre los diferentes biocatalizadores de forma que en el medio de reacción haya la misma cantidad de enzima. Según Nakaoki et al. [207], Novozym[®] 435 contiene ~200 mg de CalB por gramo de derivado enzimático, lo que concuerda con los datos reflejados por la empresa Novozymes para dicho producto (Tabla 3.1 de Materiales y métodos), por lo que para llevar a cabo esta serie experimental se ha escogido como cantidad de lipasa en el medio la que según estos autores habría inmovilizada en 0.25 g del biocatalizador comercial: 50 mg de enzima.

A tenor de los resultados de las distintas inmovilizaciones, descritos en el Sección 4.2.2, se requerirán cantidades diferentes de los preparados de Lipozyme[®] CALB L para conseguir este objetivo. Éstas se pueden consultar en la Tabla 4.11. Todos los ensayos han sido realizados en el reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm para la síntesis de espermaceti.

Biocatalizador	Carga enzimática (mg _p /g)	Masa de biocatalizador a emplear (g)
Novozym [®] 435	200	0.2500
Lewatit	71.8 ± 3.2	0.6964
Amberlite	115.9 ± 7.0	0.4313
ECR 1090 M	122.9 ± 8.1	0.4067
ECR 8806 M	84.2 ± 2.1	0.5938
ECR 8285 M	124.5 ± 5.0	0.4016

Tabla 4.11- Cantidades de derivado inmovilizado empleadas para llevar a cabo la comparación de la actividad de los distintos derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L con Novozym[®] 435.

En la Figura 4.24 se comparan los primeros 120 min de las reacciones catalizadas por Novozym[®] 435 y Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M, los tres derivados obtenidos por inmovilización sobre una matriz de poliestireno, mientras que los valores para los 360 min de ensavo se pueden consultar en el Anexo VI. Como se puede ver, los tres biocatalizadores desarrollados en el laboratorio consiguen catalizar la reacción de esterificación entre el alcohol cetílico y los ácidos del espermaceti con mayor eficacia que el producto comercial. Teniendo en cuenta que según datos bibliográficos [203,207,219], Novozym[®] 435 está compuesto de polimetacrilato de metilo y tiene un tamaño de poro intermedio al de Lewatit y Amberlite, parece que la naturaleza moderadamente hidrófoba de dicho soporte y su menor área superficial son en gran parte causa de que el biocatalizador comercial presente una menor actividad que el resto, siempre y cuando se cumpla que su carga enzimática sea de ~200 mg_p/g. únicamente los Centrándonos en derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L, resulta evidente que Lewatit y Amberlite presentan una evolución de la conversión con el tiempo idéntica al igualar la cantidad de enzima en el medio, por lo que se puede concluir que ambos soportes permiten exhibir a CalB la misma actividad independientemente de sus propiedades más allá de su composición. No obstante, considerar sólo la aptitud del poliestireno como material para elaborar los biocatalizadores no permite explicar la mayor velocidad de reacción observada para ECR 1090 M: así, mientras que la naturaleza del soporte es la adecuada para que la enzima manifieste una buena actividad catalítica, de nuevo se pone de manifiesto que el tamaño de poro de ECR 1090 M facilita la transferencia de materia y permite conseguir mayores valores de la conversión en tiempos más cortos, lo que está en consonancia con los resultados observados en el Apartado 4.3.2.1.



Figura 4.24- Síntesis de espermaceti en el reactor de altas prestaciones con Novozym[®] 435 y los biocatalizadores basados en matrices de poliestireno (Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M) con la misma cantidad de enzima en el medio de reacción (20 g, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

La evolución de la esterificación durante los 120 primeros minutos de la experimentación a igualdad de enzima en el medio con el soporte ECR 8806 M, se coteja con la de Amberlite y Novozym[®] 435 en la Figura 4.25. Como se puede constatar, en tan sólo 15 min, empleando el derivado de ECR 8806 M es posible alcanzar un 82.83% de conversión, frente al 58.35% y 44.77% para el otro biocatalizador desarrollado en el laboratorio y el comercial, respectivamente. Esto corrobora las observaciones realizadas durante el estudio de la influencia de la concentración de biocatalizador para ECR 8806 M, que son extrapolables a la comparación de los resultados con Novozym[®] 435. En ellas se concluyó que el mayor tamaño de poro y, especialmente, la naturaleza del soporte favorecían el proceso de síntesis. Además, la matriz de metacrilato de octadecilo de ECR 8806 M parece favorecer la actividad de CalB, lo que comparado concretamente con el caso de Novozym[®] 435, elaborado por inmovilización sobre metacrilato de metilo, podría deberse a la sustitución de los radicales metilo por las cadenas largas de 18 carbonos, propiciando así una mayor interacción hidrófoba entre el soporte y la enzima.



Figura 4.25- Síntesis de espermaceti en el reactor de altas prestaciones con Novozym[®] 435, Amberlite y ECR 8806 M con la misma cantidad de enzima en el medio de reacción (20 g, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En cuanto a ECR 8285 M, en la Figura 4.26 se puede advertir que a igualdad de enzima en el medio, es posible alcanzar mayores velocidades de reacción con dicho biocatalizador que con Novozym[®] 435. Por lo tanto, se puede afirmar que las modificaciones realizadas sobre la estructura de CalB al ser inmovilizada sobre la resina epóxida ECR 8285 M por enlace covalente no producen pérdidas de su actividad catalítica comparado con esta lipasa inmovilizada por adsorción que, como ya se comentó en los Antecedentes de este trabajo, es un proceso de inmovilización que no produce una modificación de la conformación de la enzima y no conlleva grandes pérdidas de su actividad. Cabe destacar además, que el tamaño de poro de ECR 8285 M es ~3 veces mayor que el del biocatalizador comercial, por lo que no se puede obviar la gran contribución de este parámetro a una mayor difusión de los sustratos y

productos en el microentorno del derivado inmovilizado y, en consecuencia, a unos mejores resultados en esta serie experimental.



Figura 4.26- Síntesis de espermaceti en el reactor de altas prestaciones con Novozym[®] 435 y ECR 8285 M con la misma cantidad de enzima en el medio de reacción (20 g, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En la Tabla 4.12 se comparan de forma numérica las distintas velocidades de reacción alcanzadas a los 15 min de ensayo al trabajar con la misma cantidad de CalB en el medio de reacción.

Tabla 4.12-	Velocidad	de reace	ción para	un tie	empo de	operación	de 15	5 min,	en	los
ensayos real	izados a igi	ualdad de	cantidad	de enz	ima en el	l medio (50	mg te	oricos)).	

Biocatalizador	Novozym [®] 435	Lewatit	Amberlite	
Velocidad de reacción (ΔN.A./min)	3.81	4.51	4.77	
Biocatalizador	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M	
Velocidad de reacción (ΔN.A./min)	6.52	6.43	6.77	

Como se puede observar, independientemente de la naturaleza química del soporte y de la técnica de inmovilización empleada, los biocatalizadores elaborados con las matrices ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M presentan valores similares para este parámetro y superiores al del resto de biocatalizadores empleados en esta serie experimental. Estos tres soportes presentan diámetros de partícula diferentes entre ellos, aunque el de ECR 1090 M se asemeja al de Lewatit y Amberlite, por lo que este parámetro no permite explicar dicha

observación. Por su parte, el área superficial es dispar entre los soportes de absorción, y carece de sentido práctico en el caso de la resina covalente, por lo que no parece tener relación con estos resultados de velocidad. En consecuencia, todo apunta a que, como se ha mencionado anteriormente, es el mayor tamaño de poro el que permite la mejora de la cinética de la reacción, requiriéndose, al parecer, tamaños de más de 400 Å para reducir las limitaciones difusionales de forma significativa (ver Tablas 3.1 y 3.3 de Materiales y métodos). Asimismo, la menor velocidad de Novozym[®] 435 a pesar de poseer mayor tamaño de poro que Lewatit, estaría provocada por la mayor afinidad de CalB por las matrices poliestireno, tal y como han observado otros autores [206].

Por último, cabe mencionar que aunque las resinas ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M son las que muestran una mayor velocidad de reacción, sólo una de ellas tiene una estabilidad operacional comparable a la de los derivados comerciales.

4.4. Modelo cinético de la síntesis de espermaceti.

4.4.1. Hipótesis del modelo cinético.

En base a los resultados experimentales obtenidos durante la reacción de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico con el alcohol cetílico, se ha abordado el desarrollo de un modelo cinético simplificado que permita describir dicho proceso.

Para ello se ha tenido en cuenta que, al trabajar en un medio de reacción heterogéneo en el que la lipasa está inmovilizada en una partícula sólida, las concentraciones de las especies que intervienen en la esterificación serán diferentes en el microentorno de la enzima y en el seno del medio de reacción. Por lo tanto, a la hora de estudiar la velocidad del proceso, no sólo habrá que considerar la propia cinética de la esterificación, sino también los fenómenos de transporte de materia.

En este sentido, teniendo en cuenta que la viscosidad del sistema de estudio es elevada, para llevar a cabo el modelo cinético que describa el proceso de síntesis, se ha supuesto que etapa controlante es el transporte externo de materia. Esta hipótesis conlleva pues que las concentraciones de las especies reaccionantes serán pequeñas en el microentorno de la lipasa, y la reacción tendrá lugar prácticamente sólo en los centros activos ubicados en la superficie de las partículas catalíticas.

De este modo, llamando A al ácido, B al alcohol y P al éster formado, el proceso global de la síntesis de los ésteres que componen el blanco de ballena se puede esquematizar mediante las etapas siguientes [104,135,220]:

- 1) Transporte de A y B desde de la mezcla de reacción hasta la superficie de las partículas catalíticas que contienen la enzima inmovilizada.
- 2) Adsorción de A sobre los centros activos de la enzima.
- 3) Formación de un compuesto intermedio de la especie *A* adsorbida.
- 4) Reacción de *B* con el intermedio formado a partir de *A* adsorbida y formación del producto de reacción, *P*, y agua.
- 5) Desorción de *P*.
- 6) Transporte de *P* al seno del fluido.

De estas etapas, se ha supuesto que la etapa controlante del proceso global, y por lo tanto la que determina la velocidad de reacción, es el transporte de las especies A y B desde el seno de la disolución hasta la superficie de las partículas catalíticas.

Por otra parte, al considerar que la reacción es más rápida que el transporte de materia, la concentración de sustratos en las proximidades de la enzima, C_A^* y C_B^* , debe ser pequeña comparada con dicha concentración en el seno de la mezcla de reactivos, C_A y C_B .

El proceso de síntesis se ha realizado utilizando cantidades estequiométricas de ambos sustratos, de forma que ni el ácido ni el alcohol se encuentren en exceso en el medio de reacción, por lo que la concentración de ambas especies variará de forma idéntica a lo largo del proceso y no existe un reactivo limitante. Sin embargo, ya que el mecanismo de reacción de las lipasas propuesto en la literatura sugiere que el primer intermedio tetraédrico formado durante la esterificación es el que integra al ácido [135,220], se va a tomar como compuesto de referencia dicho sustrato, denominado previamente como A.

De este modo, tenemos que la velocidad de transporte, $(r)_{VR}$, de dicho compuesto a lo largo de la película estacionaria, referida a la unidad de volumen del reactor, viene dada por la expresión:

$$(r)_{V_R} = k_L a (C_A - C_A^*)$$
 Ec. 4.1

donde:

 $(r)_{V_R}$ es la velocidad de transporte de materia (mol L⁻¹ min⁻¹),

 $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia (min⁻¹),

 C_A es la concentración de A en el seno del fluido (mol L⁻¹),

 C_A^* es la concentración de A en las proximidades de la enzima (mol L⁻¹).

En lo que respecta al proceso de adsorción del reactivo A en los centros activos, se considera alcanza el equilibrio, de modo que, si designamos por l a uno de los centros activos de la enzima, se tiene que:

$$A + l \Leftrightarrow Al$$

$$K_A = \frac{C_{Al}}{C_A^* C_l} \qquad Ec. \ 4.2$$

donde:

 K_A es la constante de equilibrio de la adsorción (L mol⁻¹),

 C_{Al} es la concentración de *A* adsorbida en los centros activos expresada en función de la masa de biocatalizador (mol g⁻¹),

 C_A^* es la concentración de A en las proximidades del biocatalizador (mol L⁻¹),

 C_l es la concentración de centros activos *l* disponibles expresada en función de la masa de biocatalizador (mol g⁻¹).

Asimismo, el balance total de centros activos establece que:

$$L = C_{Al} + C_l \qquad Ec. 4.3$$

donde:

L es la concentración total de centros activos expresada en función de la masa de biocatalizador (mol g^{-1}).

- 137 -

De la Ecuación 4.2, que describe equilibrio de adsorción de A, se tiene que:

$$C_l = \frac{C_{Al}}{K_A C_A^*} \qquad \qquad Ec. \ 4.4$$

y sustituyendo dicho valor en la Ecuación 4.3 queda:

$$L = C_{Al} \left(1 + \frac{1}{K_A C_A^*} \right) = C_{Al} \left(\frac{1 + K_A C_A^*}{K_A C_A^*} \right)$$
 Ec. 4.5

de donde:

$$C_{Al} = \frac{K_A L C_A^*}{1 + K_A C_A^*}$$
 Ec. 4.6

Puesto que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de *A* adsorbida sobre las partículas catalíticas que contienen la lipasa, C_{Al} , teniendo en cuenta la Ecuación 4.6, la velocidad de la reacción enzimática referida a la masa de biocatalizador, $(r)_{mE}$, se puede expresar como:

$$(r)_{m_E} = kC_{Al} = \frac{kK_A LC_A^*}{1 + K_A C_A^*}$$
 Ec. 4.7

donde:

 $(r)_{mE}$ es la velocidad de la reacción (mol g⁻¹ min⁻¹),

k es la constante cinética de la reacción enzimática (min⁻¹).

Como se ya se ha expuesto previamente, C_A^* debe ser muy pequeña, por lo que el denominador de la Ecuación 4.7 es prácticamente igual a la unidad, de forma que:

$$(r)_{m_E} = kC_{Al} = kK_A LC_A^* \qquad Ec. 4.8$$

Dado que el transporte de materia y la reacción enzimática transcurren en serie, ambas etapas deben tener el mismo valor de la velocidad, si bien es condición necesaria que ésta se refiera, bien al volumen del reactor o bien a la masa de biocatalizador. Teniendo en cuenta esto, se verifica que:

$$\frac{k_L a(C_A - C_A^*)}{C_E} = k K_A L C_A^* \qquad Ec. 4.9$$

donde:

$$C_E$$
 es la concentración de biocatalizador en el medio de reacción (g L⁻¹).

Operando en la Ecuación 4.9:

$$k_L a C_A = k_L a C_A^* + C_E k K_A L C_A^* \qquad Ec. 4.10$$

Por lo que, de este modo, se puede calcular el valor de C_A^* en función de valores de concentración que se pueden medir en el reactor, obteniendo:

$$C_A^* = \frac{k_L a}{k_L a + k K_A L C_E} C_A \qquad Ec. 4.11$$

Sustituyendo en la Ecuación 4.8 se obtiene que:

$$(r)_{m_E} = \frac{k_L a k K_A L}{k_L a + k K_A L C_E} C_A \qquad Ec. 4.12$$

Teniendo en cuenta que:

$$C_E = \frac{m_E}{V_R} \qquad \qquad Ec. \ 4.13$$

donde:

 m_E es la masa de biocatalizador en el reactor (g),

 V_R es el volumen del reactor (L).

reemplazando y operando en la Ecuación 4.12, la velocidad de reacción queda en:

$$(r)_{m_E} = \frac{k_L a k K_A L V_R}{k_L a V_R + k K_A L m_E} C_A \qquad Ec. 4.14$$

Haciendo un balance de la especie A en el reactor tanque discontinuo de altas prestaciones, y teniendo en cuenta que el medio de reacción es heterogéneo, tenemos que:

$$V_R \frac{dC_A}{dt} + m_E(r)_{m_E} = 0$$
 Ec. 4.15

Sustituyendo en la ecuación anterior el valor de la velocidad $(r)_{mE}$ y operando nos queda:

$$\frac{dC_A}{dt} + \frac{k_L a k K_A L m_E}{k_L a V_R + k K_A L m_E} C_A = 0 \qquad Ec. 4.16$$

Puesto que, para un ensayo dado, la cantidad de catalizador enzimático en el medio de reacción es constante, la velocidad global del proceso puede, pues, describirse siguiendo una ley de orden 1:

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_r C_A \qquad \qquad Ec. \ 4.17$$

donde k_r (min⁻¹) es la constante cinética global que describe el proceso:

$$k_r = \frac{k_L a k K_A L m_E}{k_L a V_R + k K_A L m_E}$$
 Ec. 4.18

Separando variables en la Ecuación 4.17 y tomando los límites de integración pertinentes, nos queda:

$$\int_{C_{Ao}}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A} = -k_r \int_0^t dt \qquad Ec. 4.19$$

donde:

 C_{Ao} es la concentración inicial de A,

t es el tiempo de reacción (min).

Integrando la Ecuación 4.19 llegamos a la expresión:

$$C_A = C_{Ao} e^{-k_r t} \qquad \qquad Ec. \ 4.20$$

Teniendo en cuenta que la conversión x para un tiempo dado es:

$$x = \frac{C_{Ao} - C_A}{C_{Ao}} \qquad \qquad Ec. \ 4.21$$

podemos expresar la Ecuación 4.20 en función de dicha magnitud:

$$x = 1 - e^{-k_r t}$$
 Ec. 4.22

De este modo, empleando la Ecuación 4.22 debe ser posible conocer el valor de la constante cinética de pseudo-primer orden, k_r , que describe el proceso de síntesis de los ésteres del espermaceti (ya sea por separado o de forma simultánea) a partir de los valores experimentales de la conversión a distintos tiempos de operación.

Asimismo, como se puede constatar en la Ecuación 4.18, la constante global del proceso, k_r , está relacionada con el valor de la cantidad de catalizador enzimático presente en el medio de reacción m_E . De este modo, tomando valores inversos de dicha ecuación se establece que para los experimentos realizados a temperatura y concentración de sustratos constantes pero con diferentes cantidades de biocatalizador, debe existir una relación lineal entre el inverso de la constante de velocidad global, k_r , y la cantidad total de derivado inmovilizado en el reactor, m_E :

$$\frac{1}{k_r} = \frac{1}{k_L a} + \frac{V_R}{k K_A L} \frac{1}{m_E}$$
 Ec. 4.23

4.4.2. Aplicación del modelo cinético a la síntesis de los ésteres cetílicos por separado.

4.4.2.1. Determinación de la constante cinética global del proceso.

Como se ha concluido en el modelo cinético propuesto previamente, se debe poder describir el proceso de síntesis enzimática de los cuatro principales componentes del blanco de ballena mediante la utilización de una cinética de pseudo-primer orden:

$$x = 1 - e^{-k_r t}$$
 Ec. 4.22

Para ello, se ha empleado el software CurveExpert Basic 1.40, que posibilita el ajuste de datos a regresiones no lineares de forma rápida y sencilla, permitiendo evaluar la adecuación de la Ecuación 4.22 a la hora de predecir los datos experimentales obtenidos en apartados anteriores.

Los resultados de dicho ajuste se han representado de forma gráfica en las Figuras 4.27 a 4.35, mientras que los valores de conversión devueltos por el programa informático correspondientes al ajuste de los ensayos realizados en la síntesis de laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo con diferentes cantidades de biocatalizador pueden consultarse en el Anexo VII.

En dichas figuras se puede apreciar que el modelo planteado en el Apartado 4.4.1 refleja de forma adecuada el comportamiento del sistema desde un punto de vista cinético, confirmando que, de forma general, la elevada resistencia al transporte externo de materia en el medio de reacción hace de ésta la etapa controlante durante la obtención de los ésteres cetílicos. La fase de síntesis enzimática en sí misma, por lo tanto, permanece por lo general en un segundo plano, en parte debido a la buena actividad que exhiben las lipasas inmovilizadas estudiadas para este proceso.

Centrándonos únicamente en los productos comerciales (Figuras 4.27 a 4.30), cabe destacar que el modelo se adecua con gran exactitud a los datos experimentales de los ensayos realizados con los dos derivados de CalB y de forma muy notoria a los resultados obtenidos con Lipozyme[®] RM IM, tal y como queda confirmado por que los valores del coeficiente de correlación lineal, r, sean siempre superiores a 0.99 y el error estándar, S, del orden de 10⁻² (Anexo VII). Sin embargo, se pueden constatar pequeñas variaciones entre el valor de conversión predicho y el experimental para los ensayos realizados con la menor cantidad de Lipozyme[®] TL IM, ya que en ese caso la cinética de la reacción en sí misma podría tener una mayor relevancia y justificaría que el valor óptimo de biocatalizador escogido en el Apartado 4.1.2.1 sea el doble que para el resto de los productos comerciales.



Figura 4.27- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.28- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.29- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.30- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.31- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.32- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.33- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).


Figura 4.34- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.35- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de laurato (a), miristato (b), palmitato (c) y estearato de cetilo (d) utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

Un razonamiento similar se puede llevar a cabo en lo que respecta a los resultados obtenidos para los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L (Figuras 4.31 a 4.35), ya que como se puede observar, existe un mejor ajuste al aplicar el modelo a los datos de los ensayos realizados a mayor concentración de enzima en el medio de reacción, poniendo en evidencia que es la transferencia de materia externa la etapa controlante del proceso, y que al disminuir la velocidad de la reacción por una menor cantidad de biocatalizador en el medio, el modelo pierde ligeramente su precisión. Este efecto es especialmente evidente en los ensavos realizados empleando el biocatalizador de Lewatit, ya que aunque se ha observado que la enzima que contiene presenta una actividad similar a la de otros derivados inmovilizados (Sección 4.3.2.6), su menor contenido en lipasa inmovilizada hace más visible la contribución de la etapa de síntesis enzimática en la velocidad global del proceso. Cabe destacar también que, en el caso concreto de la síntesis de laurato de cetilo con 0.125 g del derivado inmovilizado sobre ECR 8285 M, reflejado en la Figura 4.35 a, las dificultades del modelo para predecir la evolución de la conversión con el tiempo se deben mayoritariamente al comportamiento anómalo del proceso de síntesis observado durante la realización de dicho experimento, que ha sido previamente discutido en el Apartado 4.3.2.1.

Una manera sencilla de comprobar la bondad del modelo es representar gráficamente la variable predicha frente a su correspondiente valor experimental. De este modo, en la Figura 4.36 se comparan los valores de la conversión calculada mediante el modelo de pseudo-primer orden con los datos recopilados durante los distintos ensayos de síntesis de los ésteres cetílicos por separado para el peor y el mejor ajuste de todos, el de Lewatit (a) y el de CalB immo Plus (b).



Figura 4.36- Comparación de los valores de conversión predichos por el modelo con los experimentales para la síntesis de los ésteres cetílicos por separado empleando Lewatit (a) y CalB immo Plus (b).

Como se puede observar, en el caso del biocatalizador comercial (Figura 4.36 b) el coeficiente de regresión cuadrático indica que los datos siguen claramente un tendencia lineal, describiendo una recta cuya pendiente es cercana a la unidad debido a la similitud entre la conversión real y la predicha, y en consecuencia al elevado grado de ajuste del modelo. Por la pendiente de la recta, se puede concluir que el comportamiento de Lewatit es el que peor se describe con el modelo escogido (Figura 4.36 a). No obstante, aunque se observa que los datos se desvían un poco más de la linealidad, el coeficiente de regresión R^2 presenta un valor relativamente elevado. El resto de biocatalizadores presentan valores intermedios entre éstos.

En general y de forma cuantitativa, los valores de conversión calculados mediante la Ecuación 4.22 reproducen de forma más fidedigna los resultados experimentales obtenidos con los biocatalizadores comerciales que los de los derivados de Lipozyme[®] CALB L. Esto podría estar ocasionado por el menor tamaño de poro de los productos de Novozymes y Purolite/c-LEcta, que no permitiría que se produzca de manera apreciable la difusión de las distintas especies en el interior de éstos, etapa que no ha sido considerada en las hipótesis del modelo. Además, la cantidad de lipasa inmovilizada en estos biocatalizadores es mayor a la de los derivados desarrollados para este trabajo, lo que supone una garantía más de que la etapa controlante del proceso no debe ser la de reacción, aun cuando los ensayos realizados a igualdad de enzima en el medio pongan de manifiesto que Novozym[®] 435 exhibe menos actividad que la de los catalizadores obtenidos en el laboratorio.

Por otra parte, los valores de la constante cinética global de pseudo-primer orden, k_r , calculados con el software CurveExpert Basic 1.40, y su relación con la cantidad de derivado inmovilizado presente en el reactor (que se discutirá en el siguiente apartado) se pueden consultar tanto en la Tabla 4.13 como en el Anexo VII. En ella, se puede apreciar que, para los ensayos realizados con una misma concentración de derivado inmovilizado, los valores de la constante de velocidad global son similares para los biocatalizadores comerciales y los desarrollados en el laboratorio, a excepción de los dos más lentos, Lipozyme[®] TL IM y Lewatit. Los resultados presentados en esta tabla, confirman además que, en el caso de los derivados disponibles en el mercado, son los elaborados con CalB los que mejores resultados producen desde un punto de vista técnico.

En lo que concierne a la influencia del éster sintetizado en la constante cinética global, parece que, en rasgos generales, a mayor longitud de cadena menor es k_r para una misma cantidad de biocatalizador. No obstante, como se puede ver en la Tabla 4.13, esta tendencia no se cumple de forma estricta, y las variaciones entre un valor y otro de la constante son pequeñas, de modo que, en la práctica, el número de carbonos que componen el éster no ejerce una gran influencia en la velocidad de reacción, como ya se observó en los Apartados 4.1.2.1 y 4.3.2.1.

Derivado inmovilizado		Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)				
		Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo	
	0.125 g	0.0190	0.0206	0.0197	0.0171	
Plus	0.25 g	0.0404	0.0391	0.0355	0.0353	
mmo	0.5 g	0.0826	0.0781	0.0696	0.0680	
alB i	1 g	0.1309	0.1240	0.1060	0.1116	
C	1/k _r vs 1/m _E	$y=6.5112x -0.1591$ $R^{2}=0.9969$	$y=5.8639x +1.7874 \\ R^2=0.9992$	$y=5.9681x + 3.2892 \\ R^2=0.9982$	$\begin{array}{c} y = 7.1534x + 0.8162 \\ R^2 = 0.9982 \end{array}$	
	0.125 g	0.0187	0.0185	0.0197	0.0150	
435	0.25 g	0.0426	0.0353	0.0418	0.0352	
zym®	0.5 g	0.0874	0.0829	0.0893	0.0859	
Vovoz	1 g	0.1349	0.1343	0.1340	0.1249	
F	1/k _r vs 1/m _E	y= 6.7061x -1.1983 R ² = 0.9923	y= 6.8106x - 0.0418 $R^2 = 0.9970$	y= 6.3210x -0.3561 R ² = 0.9959	y= 8.5979x -3.6126 R ² = 0.9906	
M	0.125 g	0.0179	0.0165	0.0163	0.0149	
SM I	0.25 g	0.0329	0.0356	0.0353	0.0318	
ne [®] I	0.5 g	0.0620	0.0605	0.0659	0.0543	
0Zyr	1 g	0.1163	0.1015	0.1074	0.0996	
Lip	1/k _r vs 1/m _E	$y= 6.7074x + 2.573$ $R^2 = 0.9987$	y=7.2404x +1.587 $R^2 = 0.9945$	$y=7.4863x + 0.4365 \\ R^2=0.9956$	$y=8.1407x +1.283 \\ R^2=0.9961$	
	0.125 g	0.0028	0.0033	0.0033	0.0029	
IM	0.25 g	0.0069	0.0075	0.0073	0.0069	
[®] TL	0.5 g	0.0161	0.0169	0.0158	0.0158	
zyme	1 g	0.0357	0.0405	0.0380	0.0356	
Lipo	2 g	0.0814	0.0828	0.0778	0.0694	
	$\frac{1/k_r \ vs}{1/m_E}$	$y = 45.774x - 21.874$ $R^{2} = 0.9926$	y = 38.755x - 14.141 R ² = 0.9978	$y = 39.544x - 13.278$ $R^2 = 0.9977$	$y = 43.974x - 18.054$ $R^2 = 0.9945$	

Tabla 4.13- Valores de la constante cinética global, k_r (min⁻¹), y su relación con la cantidad de biocatalizador en el medio, m_E (g), para l síntesis de los ésteres cetílicos por separado.

Derivado inmovilizado		Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)				
		Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo	
	0.125 g	0.0088	0.0078	0.0079	0.0089	
	0.25 g	0.0211	0.0217	0.0229	0.0203	
atit	0.5 g	0.0514	0.0515	0.0496	0.0457	
Lewa	1 g	0.1110	0.0908	0.0964	0.0855	
<u> </u>	2 g	0.1080	0.1029	0.1031	0.0993	
	1/k _r vs 1/m _E	y= 14.434x - 4.9135 $R^2 = 0.9860$	$y=16.057x - 7.0053$ $R^{2} = 0.9720$	$y=15.874x - 7.1226$ $R^{2}=0.9679$	y=13.975x -2.2974 R2 = 0.9903	
	0.125 g	0.0170	0.0166	0.0163	0.0149	
te	0.25 g	0.0372	0.0320	0.0308	0.0285	
berli	0.5 g	0.0706	0.0663	0.0639	0.0621	
Am	1 g	0.1233	0.1216	0.1090	0.0962	
	1/k _r vs 1/m _E	y=7.2948x -0.3568 $R^2=0.9962$	$\begin{array}{l} y = 7.4973x + 0.6355 \\ R^2 = 0.9995 \end{array}$	$y=7.5316x + 1.4396 \\ R^2=0.9990$	$\begin{array}{c} y = 8.2585x + 1.2034 \\ R^2 = 0.9979 \end{array}$	
	0.125 g	0.0208	0.0227	0.0291	0.0282	
M	0.25 g	0.0587	0.0669	0.0632	0.0569	
1090	0.5 g	0.1044	0.1004	0.1003	0.0892	
ECR	1 g	0.1184	0.1099	0.1111	0.1023	
<u>H</u>	1/k _r vs 1/m _E	y= 5.8518x -1.1834 R ² = 0.9537	$\begin{array}{c} y = 5.1522x + 0.1707 \\ R^2 = 0.9325 \end{array}$	$y=3.7476x + 3.2332 \\ R^2=0.9717$	$y=3.7847x + 4.3231 \\ R^2=0.9818$	
	0.125 g	0.0282	0.0308	0.0285	0.0290	
6 M	0.25 g	0.0680	0.0637	0.0616	0.0626	
880	0.5 g	0.1064	0.1109	0.1045	0.0957	
ECR	1 g	0.1183	0.1206	0.1273	0.1155	
Η	1/k _r vs 1/m _E	y=3.9922x+2.0378 $R^2=0.9593$	y=3.5879x+2.9072 $R^{2}=0.9803$	y=3.9961x+2.2051 $R^{2}=0.9833$	$y=3.7688x + 3.2509 \\ R^2 = 0.9773$	
	0.125 g	0.0106	0.0198	0.0171	0.0246	
M	0.25 g	0.0590	0.0704	0.0554	0.0582	
8285	0.5 g	0.1144	0.1085	0.1093	0.0981	
ICR	1 g	0.1198	0.1203	0.1204	0.1147	
щ	1/k _r vs 1/m _E	y=12.766x - 15.771 $R^2 = 0.8983$	y=6.2182x - 2.783 $R^2 = 0.9191$	$y=7.4574x - 4.4571 \\ R^2=0.9441$	$y=4.6949x + 1.5663 \\ R^2=0.9713$	

4.4.2.2. Relación entre la constante cinética global y la cantidad de biocatalizador presente en el reactor.

Del análisis de los datos contenidos en la Tabla 4.13 del apartado anterior, se habrá podido constatar que, como cabía esperar, el valor de la constante cinética global se va haciendo mayor al ir incrementando la cantidad de biocatalizador en el medio. Sin embargo, este aumento no se da de forma proporcional, y resulta evidente que es menos acusado, en términos relativos, cuanto mayor es la concentración de derivado inmovilizado en el medio. Así, en algunos casos, el valor de k_r es semejante al de la constante cinética calculada para la mitad de biocatalizador, momento en el que en las Figuras 4.27 a 4.35 se ven las curvas representativas de esos ensayos superpuestas. Un ejemplo de ello se da en la síntesis de laurato de cetilo empleando ECR 1090 M, en la que se puede observar que la constante de velocidad calculada para los ensayos realizados con 0.5 y 1 g de enzima es 0.1044 y 0.1184 min⁻¹, respectivamente.

En este sentido, durante el desarrollo del modelo cinético simplificado, se concluyó que podría existir una relación lineal entre las inversas de la constante de pseudo-primer orden, k_r , y de la masa de biocatalizador presente en el medio de reacción, m_E , tal y como se refleja en la Ecuación 4.23:

$$\frac{1}{k_r} = \frac{1}{k_L a} + \frac{V_R}{kK_A L} \frac{1}{m_E}$$
 Ec. 4.23

De este modo, se llevó a cabo el ajuste de los valores de la constante cinética y la cantidad de derivado inmovilizado siguiendo dicha ecuación, obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 4.13, donde y representa la inversa de k_r y x es la inversa de m_E . Como se puede observar, los valores del coeficiente de regresión cuadrático (R^2) confirman claramente la validez del modelo para los ensayos realizados con los derivados comerciales, mientras que el valor de este parámetro estadístico es inferior a 0.9900 para los inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L, exceptuando el caso de Amberlite. Estos resultados podrían explicarse debido al solapamiento de las curvas representativas de los ensayos realizados a mayor concentración de biocatalizador para Lewatit, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M, ya que, como se comentó previamente en la Sección 4.3.2.1, en dichos experimentos el medio de reacción parece "saturado" de biocatalizador, de forma que el aumento de la cantidad de enzima en el medio de reacción no se reflejaba en un incremento más acusado de la conversión con el tiempo. En consecuencia, si, a modo de ejemplo, para ECR 8806 M no se consideraran los datos correspondientes a los experimentos realizados con la mayor cantidad de derivado inmovilizado (1 g) se produciría la mejora del coeficiente de regresión lineal que se puede ver en la Tabla 4.14.

Compuesto sintetizado	Coeficiente de regresión R ²				
Compuesto sintenzano —	Considerando 1 g	Sin considerar 1 g			
Laurato de cetilo	0.9593	0.9806			
Miristato de cetilo	0.9803	0.9973			
Palmitato de cetilo	0.9833	0.9938			
Estearato de cetilo	0.9773	0.9874			

Tabla 4.14- Coeficiente de regresión cuadrático obtenido al ajustar k_r y m_E a la Ecuación 4.23 para la síntesis de los ésteres cetílicos por separado con ECR 8806 M.

Volviendo a la Tabla 4.13, es posible observar, además, que el valor de la pendiente para los ensayos realizados con los biocatalizadores Lipozyme[®] TL IM y Lewatit, con los que el proceso transcurre a menor velocidad, es habitualmente más acusada que para el resto de derivados inmovilizados, lo cual resulta lógico si se tiene en cuenta que la pendiente engloba en su denominador a la constante cinética de la reacción enzimática, k, y la concentración total de centros activos para un biocatalizador dado, L, cuyos valores deben ser menores para ambos biocatalizadores.

4.4.3. Aplicación del modelo cinético a la síntesis del blanco de ballena.

4.4.3.1. Determinación de la constante cinética global del proceso: relación con la ecuación de Arrhenius.

Al igual que para la síntesis de los ésteres por separado, se ha aplicado el modelo cinético simplificado propuesto previamente a la obtención en una sola etapa de espermaceti biotecnológico. Así pues, mediante el software CurveExpert Basic 1.40, se han ajustado a la Ecuación 4.22 los datos experimentales correspondientes a los ensayos a distintas temperaturas reflejados en los Apartados 4.1.2.2 y 4.3.2.2, obteniéndose los resultados que se recopilan en el Anexo VIII.

En las Figuras 4.37 y 4.38 se representa los valores de conversión experimental alcanzados durante los 120 primeros minutos de los ensayos realizados a 60, 70 y 80 °C y la conversión calculada siguiendo una cinética de pseudo-primer orden. De la observación de dichas gráficas resulta evidente el buen grado de ajuste del modelo a los datos experimentales, lo que corrobora la validez del modelo. No obstante, al igual que ocurría durante la síntesis de los ésteres cetílicos por separado, el modelo se muestra menos preciso a la hora de describir los resultados logrados con Lipozyme[®] TL IM y Lewatit, quizás, como ya se comentó previamente, debido a que, aun siendo la transferencia de materia la que condiciona la velocidad de reacción, ésta se vea influida de forma perceptible por la etapa de síntesis enzimática.

- 156 -



Figura 4.37- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de espermaceti a distintas temperaturas empleando la cantidad óptima de CalB immo Plus (a), Novozym[®] 435 (b), Lipozyme[®] RM IM (c) y Lipozyme[®] TL IM (d) en el reactor de altas prestaciones (20 g, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).



Figura 4.38- Ajuste del modelo cinético a la síntesis de espermaceti a distintas temperaturas empleando la cantidad óptima de Lewatit (a), Amberlite (b), ECR 1090 M (c), ECR 8806 M (d) y ECR 8285 M (e) en el reactor de altas prestaciones (20 g, 350 rpm, 54 L/h de N₂ y 160 mmHg).

En catálisis enzimática, el efecto de la temperatura sobre la constante cinética del proceso se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius siempre y cuando nos limitemos al rango de temperaturas en los que la enzima sea activa y no se produzca su desnaturalización. En la Tabla 4.15 se puede consultar el valor de la constante global de velocidad, k_r , y su relación con la expresión de Arrhenius, expresada en su forma logarítmica tal y como se refleja en la Ecuación 4.24:

$$\ln k_r = \ln A - \frac{E_a}{RT} \qquad \qquad Ec. \ 4.24$$

donde:

A es el factor de frecuencia,

 E_a es la energía de activación (J mol⁻¹),

R es la contante universal de los gases (Pa $m^3 mol^{-1} K^{-1}$),

T es la temperatura (K).

Tabla 4.15- Valores de la constante cinética global, k_r (min⁻¹), y su relación con la temperatura, para los ensayos de síntesis de espermaceti.

Derivado	Constan	Arrhenius		
inmovilizado	60 °C (333 K)	70 °C (343 K)	80 °C (353 K)	(Ec. 4.24)
CalB immo Plus	0.0583	0.0744	0.0901	$y=-2562.1x + 4.858 \\ R^2=0.9974$
Novozym [®] 435	0.0617	0.0768	0.1024	$y=-2974.7x + 6.1337 \\ R^2=0.9915$
Lipozyme [®] RM IM	0.0567	0.0640	0.0787	$\begin{array}{c} y = -1917.3x + 2.8724 \\ R^2 = 0.9716 \end{array}$
Lipozyme [®] TL IM	0.0291	0.0382	0.0346	y = -1047.2x - 0.3336 $R^2 = 0.4171$
Lewatit	0.0331	0.0505	0.0584	$y = -3358.6x + 6.7184$ $R^{2} = 0.9352$
Amberlite	0.0571	0.0686	0.0878	y = -2522.7x + 4.7006 $R^2 = 0.9898$
ECR 1090 M	0.0468	0.0572	0.0674	$y=-2140.8x + 3.3715 \\ R^2=0.9984$
ECR 8806 M	0.0508	0.0651	0.0776	$y = -2498.7x + 4.5328$ $R^{2} = 0.9937$
ECR 8285 M	0.0559	0.0704	0.0826	y = -2300.6x + 4.0335 $R^2 = 0.9924$

De la observación de la Tabla 4.15, resulta evidente que el valor de la constante cinética global aumenta con la temperatura para todos los biocatalizadores, excepto en el caso de Lipozyme[®] TL IM, que como ya se detectó en la Sección 4.1.2.2, parece sufrir fenómenos de desactivación térmica. Asimismo, es posible observar que, para una temperatura dada, se siguen manifestando las tendencias generales observadas para cada biocatalizador a lo largo de este trabajo. Esto es, de entre los derivados comerciales, son los biocatalizadores que contienen CalB, Novozym[®] 435 y CalB immo Plus, los que propician una mayor velocidad de reacción, seguidos de los derivados de Rml y Tll (incluso con el doble de producto inmovilizado en el medio de reacción). En lo que respecta a los derivados de Lipozyme[®] CALB L, se ve que para las mismas concentración de biocatalizador en el medio (0.5 g) y la misma temperatura, Amberlite proporciona velocidades de proceso mayores a las de Lewatit, mientras que 0.25 g de ECR 8806 M también mejoran la cinética del proceso frente a ECR 1090 M.

Además, como se puede constatar, para todos los biocatalizadores, los elevados valores del coeficiente de regresión cuadrático confirman el ajuste de la constante de velocidad y la temperatura a la Ecuación 4.24, a excepción, obviamente, de Lipozyme[®] TL IM, que no puede cumplir con la expresión de Arrhenius para el rango de temperaturas estudiado y del derivado inmovilizado sobre Lewatit. En este caso, a pesar de que el valor de su constante cinética es mayor al incrementarse la temperatura, el menor grado de linealidad entre el logaritmo neperiano de k_r (y en la tabla) y la inversa de la temperatura (representada por x) no parece deberse a una desactivación de la lipasa contenida en ellos, ya que éste es un biocatalizador elaborado por adsorción (técnica que apenas modifica la estructura de la enzima) y la fuente de CalB que contiene es la misma que la del resto de derivados inmovilizados en el laboratorio. Por lo tanto, quizá, el ajuste relativo de estos datos a la Ecuación de Arrhenius pueda deberse a que el efecto combinado de la temperatura sobre la transferencia de externa de masa y la cinética de la reacción enzimática se ve distorsionado por el pequeño tamaño de poro de este soporte.

Por otra parte, cabe destacar la similitud en el valor de la pendiente de las rectas de ajuste a la Ecuación 4.24 en todos los biocatalizadores elaborados con CalB, ya sean comerciales o no, e independientemente del mecanismo de inmovilización. De este modo, se ha podido calcular la energía de activación promedio para la síntesis de espermaceti utilizando biocatalizadores de CalB, que es igual a 20.79 ± 1.55 kJ/mol.

4.4.3.2. Determinación de la constante cinética global del proceso de síntesis de espermaceti mediante las constantes de los ésteres por separado.

Puesto que el blanco de ballena biotecnológico sintetizado a lo largo de este trabajo se compone de una mezcla de laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo en unas proporciones concretas [31], resulta de interés estudiar la contribución de cada uno de estos compuestos, y de su velocidad de síntesis, a la constante cinética global de pseudo-primer orden que rige la obtención de espermaceti en una sola etapa.

Para ello, tal y como se muestra a modo de ejemplo en la Tabla 4.16 para ECR 8806 M, para determinar el valor de la constante k_r del proceso de síntesis de espermaceti a 70 °C, se ha realizado la media ponderada de las contantes cinéticas obtenidas para cada uno de los ésteres cetílicos a la misma temperatura, reflejadas en el Apartado 4.4.2.1, teniendo en cuenta su concentración en la mezcla (Tabla 3.4 de Materiales y métodos). Los cálculos para el resto de derivados inmovilizados se pueden consultar en la correspondiente sección del Anexo VIII.

Tabla 4.16- Cálculo de la constante cinética global, k_r (min⁻¹), de la síntesis de espermaceti a 70 °C con ECR 8806 M a partir las constantes de velocidad obtenidas para cada uno de los ésteres cetílicos por separado.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0680	15.31	0.0104
Miristato de cetilo	0.0637	37.76	0.0240
Palmitato de cetilo	0.0616	38.78	0.0239
Estearato de cetilo	0.0626	8.16	0.0051
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0634
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0651

De este modo, siguiendo el mismo procedimiento que para ECR 8806 M, es posible comparar los valores de la contante global calculada mediante el ajuste del modelo cinético con los calculados por media ponderada de las constantes de cada éster, que se comparan en la Tabla 4.17. Como se puede apreciar, el buen grado de similitud general entre ambos valores calculados por ambas vías resulta una prueba más de la bondad del modelo cinético de pseudo-primer orden propuesto en el Apartado 4.4.1.

Tabla 4.17- Valores de la constante cinética global, k_r (min⁻¹) a 70 °C calculada a partir las constantes de velocidad obtenidas con el modelo para cada uno de los ésteres cetílicos y a través del ajuste del modelo cinético a los datos experimentales.

	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)			
Biocatalizador	Media ponderada	Modelo (datos experimentales)		
CalB immo Plus	0.0747	0.0744		
Novozym [®] 435	0.0863	0.0768		
Lipozyme [®] RM IM	0.0623	0.0640		
Lipozyme [®] TL IM	0.0384	0.0382		
Lewatit	0.0503	0.0505		
Amberlite	0.0657	0.0686		
ECR 1090 M	0.0634	0.0572		
ECR 8806 M	0.0634	0.0651		
ECR 8285 M	0.0618	0.0704		

4.5. Comparativa general de la síntesis de espermaceti en un reactor de altas prestaciones.

A lo largo de los anteriores apartados, se ha evaluado la influencia de diversos parámetros en la síntesis de espermaceti, determinándose las mejores condiciones de operación de una serie de biocatalizadores para obtener dicho producto con un alto grado de eficacia. De forma inevitable, dicho proceso ha puesto en evidencia cuales de éstos derivados inmovilizados presentan mejores aptitudes técnicas para la síntesis de la mezcla de ésteres cetílicos, por lo que se ha decidido abordar, en resumen, una comparación general del rendimiento de los catalizadores enzimáticos bajo condiciones óptimas en la que se considere también el proceso desde un punto de vista cinético.

En la Tabla 4.18 se presentan las distintas variables a comparar: la carga enzimática del derivado inmovilizado, la cantidad de biocatalizador y temperatura óptimas, la conversión alcanzada tras 60 min de reacción, la constante cinética global del proceso y el número de usos consecutivos viables bajo condiciones de operación óptimas.

En lo que concierne a las condiciones de operación seleccionadas durante la optimización del proceso, se puede observar que mientras que todos los estudios han concluido que la mejor temperatura de trabajo es 70 °C, la cantidad de biocatalizador óptima varía de un caso a otro. Así pues, mientras que para el conjunto de los inmovilizados comerciales y para dos de los propios, Lewatit y Amberlite, se requieren cantidades iguales o superiores a 0.5 g, sólo se ha de emplear 0.25 g de los derivados de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M, lo que supone un ahorro considerable en el consumo de los mismos. Como se puede apreciar en la Tabla 4.18, esto no afecta al grado conversión a los 60 min, que apenas difiere en una o dos unidades porcentuales con el valor más elevado de los que se encuentran en la tabla. En este sentido, cabe destacar que para todos los derivados enzimáticos se alcanzan conversiones superiores al 90%, siendo Lipozyme[®] TL IM el biocatalizador que conduce a una velocidad de proceso más lenta ($k_r = 0.0382 \min^{-1}$), a pesar de que se emplea 1 g de éste bajo condiciones óptimas.

Centrándonos en la cinética del proceso, se puede observar que son los dos derivados inmovilizados de CalB disponibles en el mercado, así como el obtenido por enlace covalente de los propios, los que favorecen procesos más rápidos ($k_r > 0.07 \text{ min}^{-1}$). En el caso de CalB immo Plus y Novozym[®] 435, los resultados obtenidos son tan semejantes, que sólo su coste y su disponibilidad resultan los únicos criterios para la elección de uno de ellos. No obstante, si comparamos ECR 8285 M con estos dos productos, se puede ver que, aun siendo menor su contenido en lipasa comparado con Novozym[®] 435, sólo se requiere la mitad de biocatalizador desarrollado en el laboratorio para llevar a cabo la esterificación con los mismos resultados, lo que pone además de manifiesto que la técnica de inmovilización empleada no afecta a la actividad de la enzima. A pesar de su eficacia, se ha de tener en cuenta que únicamente es posible reutilizar este biocatalizador nueve veces frente a las catorce (como mínimo) de los comerciales, por lo que solamente un menor coste podrá hacerlo competitivo.

Asimismo, cabe destacar la buena velocidad de proceso conseguida con Lipozyme[®] RM IM aunque posea en torno a un 10% en peso menos de enzima que CalB immo Plus y Novozym[®] 435. Además, su contenido en lipasa y su constante cinética global es similar a los de los derivados inmovilizados en el laboratorio con CalB, lo que pone en evidencia la buena actividad de Rml a pesar de la naturaleza menos hidrófoba del soporte de Lipozyme[®] RM IM.

Por otra parte, analizando los resultados de los tres derivados elaborados con soportes de poliestireno, se puede ver que Lewatit es el soporte que confiere al proceso la menor velocidad de reacción, debido a su contenido en lipasa y su menor tamaño de poro, como ya se discutió en la Sección 4.3.2.1. A diferencia de lo observado en aquel apartado, bajo condiciones óptimas la constante cinética global de la síntesis de espermaceti con Amberlite es mayor que la de ECR 1090 M, lo que se traduce en una mayor conversión a los 60 min de reacción, resultados que obviamente se pueden atribuir a que se empleó dos veces más masa de biocatalizador para el ensayo realizado con Amberlite (0.5 g), y por lo tanto, casi el doble de CalB en el medio de reacción. Además, ni Lewatit, con cinco usos útiles consecutivos, ni ECR 1090 M, con tres, presentan una estabilidad mecánica adecuada, por lo que sólo Amberlite parece una opción viable de cara a un posible uso industrial, a no ser que el coste de trabajar con una menor cantidad de ECR 1090 M compense económicamente su baja capacidad de ser reutilizado.

En lo que respecta al otro biocatalizador elaborado para esta Tesis Doctoral mediante adsorción, el de ECR 8806 M, se puede observar que su contenido en lipasa es mucho menor que para el resto de los biocatalizadores propios, por lo que este soporte parece presentar peores características para la inmovilización de CalB mediante el protocolo escogido, que debería ser optimizado para este soporte de forma que se mejore el rendimiento de la adsorción. No obstante, con un contenido en lipasa del ~8.4% en peso, ECR 8806 M permite alcanzar una conversión similar a la de Amberlite pero con sólo 0.25 g. Es más, este biocatalizador resulta una alternativa competitiva viable desde un punto técnico a los disponibles en el mercado, ya que es posible llevar a cabo la síntesis con la mitad de biocatalizador y utilizarlo en procesos consecutivos al menos 15 veces.

Biocatalizador	Carga enzimática (mg _p /g)	Cantidad de biocatalizador (g)	Temperatura (°C)	Conversión 60 min (%)	Constante cinética, $k_r~(\min^{-1})$	Utilizaciones viables (conversión >75%)
CalB immo Plus	 CalB	0.5	70	97.25	0.0744	15
Novozym [®] 435	150 – 250 CalB	0.5	70	97.14	0.0768	15
Lipozyme [®] RM IM	50 – 150 Rml	0.5	70	95.89	0.0640	15
Lipozyme [®] TL IM	50 – 150 Til	1	70	93.22	0.0382	15
Lewatit	71.8 ± 3.2 CalB	0.5	70	95.93	0.0505	5
Amberlite	115.9 ± 7.0 CalB	0.5	70	96.71	0.0686	15
ECR 1090 M	122.9 ± 8.1 CalB	0.25	70	95.33	0.0572	Э
ECR 8806 M	84.2 ± 2.1 CalB	0.25	70	95.70	0.0651	15
ECR 8285 M	$\begin{array}{c} 124.5\pm5.0\\ \text{CalB} \end{array}$	0.25	70	96.55	0.0704	10

4. Resultados y discusión

- 165 -

4.6. Evaluación del blanco de ballena y sus ésteres como ingredientes cosméticos.

4.6.1. Caracterización fisicoquímica de los productos biotecnológicos.

4.6.1.1. Adecuación a las especificaciones comerciales.

Más allá de la legislación descrita en el Apartado 2.2.2 de Antecedentes, actualmente no existe ninguna normativa específica que deban cumplir el espermaceti o los cuatro ésteres cetílicos en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas u organolépticas. Por lo tanto, resulta adecuado servirse de las fichas técnicas de estos productos suministradas por los fabricantes de ingredientes cosméticos como guía para evaluar su adecuación para ser utilizados como parte de una formulación cosmética.

En las Tablas 4.19 y 4.20 se recopilan algunas de estas especificaciones y se comparan con los valores obtenidos durante la caracterización de los ésteres biotecnológicos, que ha sido llevada a cabo siguiendo los protocolos descritos en las Secciones 3.2.4 y 3.2.6, incluidas en Materiales y métodos. Cabe destacar que los datos experimentales que se hallan en dichas tablas, reflejan la caracterización de productos obtenidos bajo las condiciones de síntesis óptimas. Sin embargo, mientras que para el espermaceti se ha realizado un promedio de los análisis efectuados al producto elaborado con cada uno de los biocatalizadores, debido a la similitud observada en los resultados, para la determinación de las propiedades de los ésteres por separado (exceptuando la cuantificación del número ácido) se ha tomado como referencia los productos finales de los ensayos realizados con 0.5 g de Novozym[®] 435.

Dreducto	Espermaceti				
Producto	Comercial [37]	Comercial [38]	Enzimático		
Apariencia	Copos blancos	Pellets céreos	Cera blanca		
Punto de fusión (°C)	43 - 47 46 - 49		49.5		
Número ácido (mg KOH/g muestra)	≤5.0 ≤1.5		2.26 ± 0.40		
Valor hidroxilo (mg KOH/g muestra)			3.99 ± 2.39		
Valor de saponificación (mg KOH/g muestra)	109 – 120 105 – 120		116.58 ± 7.89		
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)	≤1.0	≤1.0	0.27 ± 0.15		
Humedad (ppm)			3.6		

Tabla 4.19- Adecuación del espermaceti enzimático a las especificaciones comerciales.

Duaduata	Laurato de cetilo		Miristato de cetilo	
Producto	Comercial [43]	Enzimático	Comercial [44]	Enzimático
Apariencia	Copos blancos	Cera blanca	Sólido céreo	Cera blanca
Punto de fusión (°C)		45.6	54 - 56	55.2
Número ácido (mg KOH/g muestra)	≤3.0	2.16 ± 0.45	≤3.0	2.24 ± 0.45
Valor hidroxilo (mg KOH/g muestra)		6.59		6.79
Valor de saponificación (mg KOH/g muestra)	125 – 135	127.19	117 – 127 [47]	120.23
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)		0.47	≤0.5	0.21
Humedad (%)	<u>≤1</u>	0.45	≤0.2	0 (2.5 ppm)

Tabla 4.20- Adecuación del laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo enzimáticos a las especificaciones de los ésteres cetílicos comerciales.

Duoduoto	Palmitato de cetilo		Estearato de cetilo	
Producto	Comercial [45]	Enzimático	Comercial [46]	Enzimático
Apariencia	Copos blancos	Cera blanca	Copos blancos	Cera blanca
Punto de fusión (°C)	50 - 60	57.6		62.2
Número ácido (mg KOH/g muestra)	≤3.0	2.18 ± 0.38	≤3.0	2.35 ± 0.53
Valor hidroxilo (mg KOH/g muestra)		6.89		2.57
Valor de saponificación (mg KOH/g muestra)	100 - 120	107.38	105 - 115	112.86
Índice de yodo (g I ₂ /100 g muestra)	≤3.0	0.09		0.28
Humedad (%)	≤2	0.35	≤1	0.82

A continuación, se discutirán detalladamente cada una de las propiedades recogidas en las tablas.

• Apariencia

Como ya se comentó en la Sección 2.3.3.7 de Antecedentes, una de las mayores ventajas la síntesis de ésteres por vía enzimática es que se pueden evitar una serie de reacciones secundarias que dan lugar a productos con un olor y un color inadecuados para su

uso en cosmética. Tanto los ésteres cetílicos como la mezcla de éstos similar al espermaceti obtenidos son productos sólidos completamente blancos a temperatura ambiente, con un ligero aspecto nacarado y brillante. Al tacto, resultan ser una cera dura que se puede rascar o romper con relativa facilidad, mientras que su aroma es característico, pero resulta casi imperceptible. En la Figura 4.39 se puede apreciar la apariencia de una de las muestras de blanco de ballena biotecnológico obtenidas a lo largo de este trabajo.



Figura 4.39- Fotografía de una muestra de espermaceti sintetizado por vía biocatalítica.

• Punto de fusión

Poniendo en evidencia la alta pureza de los compuestos sintetizados por catálisis enzimática, el análisis de los productos de reacción por calorimetría diferencial de barrido (DSC) dio lugar a resultados en los que se aprecia un solo pico de fusión, correspondiente al del producto estudiado, cuyo valor se encuentra reflejado en las Tablas 4.19 y 4.20.

Como se puede ver, el punto de fusión del espermaceti biotecnológico sobrepasa ligeramente el límite superior de las dos fichas técnicas, y en el caso concreto de una de ellas, tan sólo por 0.5 °C. Esto puede ser debido a las diferencias en la formulación de este producto, ya que, tal y como se puso en evidencia en el Apartado 2.1.3 de Antecedentes, la composición del espermaceti puede variar según el espécimen de cachalote estudiado, y por lo tanto la referencias susceptibles de ser consultadas durante su elaboración, también.

Por su parte, aunque no se han encontrado especificaciones respecto al punto de fusión de los ésteres cetílicos del ácido láurico y del ácido esteárico, en el caso del miristato y del palmitato de cetilo se cumple con los requisitos de los fabricantes de estos de compuestos. Además, la tendencia creciente del punto de fusión con la longitud de cadena del éster lleva a pensar que los valores de la temperatura de fusión para el laurato y del estearato de cetilo obtenidos por DSC son consistentes.

• Número ácido

El número ácido es una medida de la cantidad de grupos ácidos no esterificados que contiene una muestra, y en consecuencia, es un indicador de en qué grado se ha completado la reacción de esterificación.

Como se puede constatar, de forma general, el espermaceti biotecnológico cumple con las exigencias de uno de los fabricantes en cuanto a este índice, pero sobrepasa por menos de una unidad de número ácido el valor deseado en la otra hoja de especificaciones. Teniendo en cuenta que el espermaceti natural contiene una pequeña fracción de alcohol cetílico, que el valor hidroxilo promedio del blanco de ballena enzimático es relativamente bajo y que no está limitado en las fichas técnicas halladas para este compuesto (como se verá a continuación), para reducir el valor del índice ácido se podría trabajar con un ligero exceso de alcohol cetílico, ya que éste permitiría desplazar el equilibrio de la síntesis a favor de la esterificación así como provocar un efecto de dilución del ácido libre residual.

En los que respecta a los ésteres por separado, se puede ver que todos cumplen con las especificaciones, y que en caso de no hacerlo, se puede optar por la solución propuesta previamente y no trabajar bajo condiciones estequiometricas.

• Valor de hidroxilo

El índice de hidroxilo cuantifica el número de grupos hidroxilos presentes en una muestra. Por lo tanto, para los compuestos que nos ocupan, resulta ser una forma más de medir el grado de esterificación alcanzado y se prevé que su valor deba ser bajo, tal y como se puede constatar en los resultados de este análisis para el espermaceti y sus ésteres, cuyo valor está comprendido entre 2 y 7 mg KOH/g.

Cabe destacar que, a pesar de no venir especificado en las fichas técnicas encontradas, la determinación del valor de hidroxilo resulta muy interesante en muestras comerciales de este tipo de ésteres, ya que, como se acaba de explicar, este índice permite conocer si el valor del número ácido ha sido conseguido por dilución con alcohol cetílico.

• Valor de saponificación

El índice de saponificación es un indicador de la cantidad de grupos carboxilos libres y esterificados que hay en la muestra, por lo que su valor debe ser constante y muy parecido al número ácido inicial de la mezcla de reacción.

Como se puede constatar en las Tablas 4.19 y 4.20, tanto el valor de saponificación del espermaceti como el de los cuatro ésteres cetílicos sintetizados por vía enzimática se encuentra dentro del rango permitido por las fichas técnicas de los productos comerciales. Además, como se puede comprobar en los Anexos III y VI, el índice de saponificación se asemeja bastante al número ácido de las muestras tomadas al inicio de las reacciones de esterificación: ~122 mg KOH/g para el espermaceti, ~128 mg KOH/g para el laurato de cetilo, ~123 mg KOH/g para el miristato, ~118 mg KOH/g para el palmitato y ~113 mg KOH/g para el estearato.

• Índice de yodo

El índice de yodo representa el grado de insaturación de una muestra, de forma que un valor elevado de éste indica la presencia de enlaces múltiples.

Consecuentemente, para el blanco de ballena y sus cuatro ésteres mayoritarios, es necesario que el índice de yodo sea lo más pequeño posible, y este requerimiento se cumple sobradamente para todos los compuestos biotecnológicos, puesto que el valor de éste parámetro es inferior a 0.5 g $I_2/100$ g. De este modo, el valor del índice de yodo determinado experimentalmente se encuentra dentro del rango especificado por los fabricantes.

• Humedad

Tal y como se puede ver en las Tablas 4.19 y 4.20, el valor de la humedad determinado por valoración Karl Fischer (Apartado 3.2.4.5 de Materiales y métodos) cumple los requerimientos indicados en las hojas de especificaciones para el laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo. En el caso del espermaceti, los fabricantes no indican un rango de humedad para su producto, aunque comparando con el de los ésteres por separado, resulta obvio que los resultados son lógicos.

A la vista de estos resultados, se puede afirmar que tanto los ésteres cetílicos como el blanco de ballena obtenidos durante este trabajo presentan unas características que se ajustan a los requerimientos del mercado de ingredientes cosméticos sin ninguna necesidad de post tratamiento tras su obtención, puesto que al trabajar en un sistema solvent-free, los productos finales no contienen trazas de disolventes peligrosos o prohibidos por la legislación en cosmética. Además, estos compuestos tienen el valor añadido de poder ser etiquetados como "naturales", dado que han sido obtenidos por síntesis biocatalítica [80,82].

4.6.1.2. Análisis de las muestras por HPLC.

Con el fin de confirmar que no se han producido reacciones secundarias durante el proceso de esterificación, y que el espermaceti biocatalítico contiene los cuatro ésteres cetílicos en las proporciones deseadas, se ha llevado a cabo el análisis de las muestras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo la metodología descrita en la Sección 3.2.4.6 de Materiales y métodos.

Con el fin de identificar cada uno de los compuestos de interés, en primer lugar se analizaron varias muestras de los sustratos y de los ésteres cetílicos por separado, cuyos cromatogramas se pueden observar superpuestos en las Figuras 4.40 y 4.41, respectivamente. Los tiempos de retención (t_r) promedio de estos análisis, se recogen en la en la Tabla 4.21 y pueden ser consultados con más detalle en el Anexo IX. Durante estos análisis previos, se pudo constatar que el método de cromatografía escogido no permite la detección del alcohol cetílico libre en la muestra, pero sí distinguir de forma diferenciada y en un tiempo de análisis razonable, el resto de especies implicadas.



Figura 4.40- Análisis por HPLC de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico, cromatogramas superpuestos.



Figura 4.41- Análisis por HPLC del laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo, cromatogramas superpuestos.

Compuesto	Tiempo de retención, t _r (min)
Ácido láurico	1.136
Ácido mirístico	1.266
Ácido palmítico	1.443
Ácido esteárico	1.689
Alcohol cetílico	No detectado
Laurato de cetilo	5.427
Miristato de cetilo	7.092
Palmitato de cetilo	9.484
Estearato de cetilo	12.439

Tabla 4.21- Tiempos de retención correspondientes a los sustratos y los productos.

Una vez identificados los tiempos de retención y la respuesta (área del pico promedio por unidad de concentración) dada por cada uno de los compuestos, se analizaron diversas muestras obtenidas de los distintos ensayos de síntesis de espermaceti, concretamente a los 15 min y del producto final. La cuantificación de estos cromatogramas se llevó a cabo considerando puros los reactivos y ésteres, ya que la reacción es prácticamente completa, no se apreciaron picos de sustratos sin reaccionar en los análisis cromatográficos y a efectos prácticos, tener en cuenta el grado de conversión alcanzado por las muestras escogidas como patrón no influye de forma significativa en los cálculos.

En lo que concierne al análisis de las muestras tomadas a los 15 min de ensayo, en la Figura 4.42 se puede observar uno de los cromatogramas obtenidos, que ha sido normalizado con respecto a la señal del pico más grande con el fin de que se puedan apreciar mejor los resultados. Al igual que para el resto de muestras intermedias, en este ejemplo se puede ver que se distinguen todos los picos correspondientes a cada uno de los ésteres así como a los sustratos ácidos. Asimismo, en la Tabla 4.22 se concretan los porcentajes, en peso, que suponen los compuestos presentes en la muestra analizada. Como se puede comprobar, los porcentajes de cada uno de los ésteres son bastante similares a la concentración esperada teóricamente, por lo que parece que las reacciones de esterificación de cada uno de los ácidos transcurren prácticamente de forma paralela y los productos se forman simultáneamente manteniendo aproximadamente la concentración de cada uno deseada en el espermaceti al final de la reacción. Este hecho confirma las observaciones realizadas en los Apartados 4.1.2.1 y 4.3.2.1, que apuntaban a que la longitud de cadena del éster apenas condiciona la velocidad a la que transcurre la síntesis conjunta en una sola etapa.



Figura 4.42- Análisis por HPLC de una muestra de espermaceti tomada a los 15 min de reacción, cromatograma normalizado.

Tabla 4.22- Composición de la muestra de espermaceti tomada a los 15 min de reacción.

Compuesto	Concentración respecto al total (% en peso)	Concentración respecto al producto (% en peso)	Concentración esperada (% en peso)
Sustratos	19.75 ± 0.35		
Laurato de cetilo		14.84 ± 0.35	15.31
Miristato de cetilo	80.25 ± 0.36	37.51 ± 0.67	37.76
Palmitato de cetilo		36.53 ± 0.55	38.78
Estearato de cetilo		10.77 ± 1.80	8.16

En cuanto a las muestras de producto final, en la Figura 4.43 se puede ver el resultado de uno de los análisis realizados por HPLC, en los que se puede apreciar que no quedan sustratos sin reaccionar o que la cantidad de estos es tan pequeña que no puede ser detectada mediante esta técnica. Además, en la Tabla 4.23 se puede comprobar que las proporciones finales son parecidas a las calculadas a los 15 min de reacción, confirmando que todas las reacciones transcurren en paralelo. De este modo se confirma que el espermaceti obtenido por vía biocatalítica presenta un elevado grado de pureza y unas proporciones de cada uno de los ésteres cetílicos similares a las que se pueden consultar en la bibliografía [31].



Figura 4.43- Análisis por HPLC de una muestra de espermaceti final, cromatograma normalizado.

 Tabla 4.23- Composición de la muestra de espermaceti obtenido mediante biocatálisis.

Compuesto	Concentración respecto al producto (% en peso)	Concentración esperada (% en peso)
Laurato de cetilo	14.89 ± 0.80	15.31
Miristato de cetilo	37.29 ± 1.10	37.76
Palmitato de cetilo	36.66 ± 1.25	38.78
Estearato de cetilo	11.16 ± 0.64	8.16

4.6.2. Efecto de los productos enzimáticos en una emulsión cosmética.

Desde hace años, el espermaceti y sus ésteres son muy valorados en la formulación de productos cosméticos, debido a sus propiedades emolientes y a que pueden ser empleados para moldear la estructura física de una formulación. Así pues, se suelen emplear en la fabricación de bálsamos, maquillajes y, principalmente, cremas. Como ya se ha comentado en el Apartado 2.2.3 de Antecedentes, este último tipo de productos está basado en la formación de emulsiones, en las que tanto la interacción entre la gran variedad de ingredientes que las constituyen, como las características fisicoquímicas propias de cada uno de los compuestos, son responsables de las propiedades del cosmético.

Por consiguiente, una vez comprobado que los ésteres cetílicos cumplen con los requerimientos del mercado para poder ser utilizados como ingredientes cosméticos, se decidió evaluar la influencia que ejercen en las características de una emulsión cosmética estándar de aceite en agua. De este modo, siguiendo las indicaciones recogidas dentro de Materiales y métodos, en la Sección 3.2.5, se han elaborado distintas cremas, cuya apariencia se puede ver en las siguientes fotografías. Como resulta evidente a simple vista, la inclusión de los ésteres del espermaceti confiere a la formulación un aspecto más denso y consistente (Figura 4.44 b) comparado con la crema sin éstos tomada como control (Figura 4.44 a).



Figura 4.44- Fotografías de una emulsión control (a) y de una de las emulsiones realizadas con palmitato de cetilo (b).

En los siguientes apartados se evalúa el efecto del espermaceti y los cuatro ésteres cetílicos en las propiedades de las emulsiones mediante las técnicas descritas a lo largo de la Sección 3.2.6 de Materiales y métodos. Asimismo, se compararán los resultados alcanzados con las cremas que contienen el laurato y el palmitato de cetilo biotecnológicos con otras formuladas con estos compuestos adquiridos en casas comerciales.

4.6.2.1. Análisis de las emulsiones cosméticas por DSC.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de gran interés para caracterizar ingredientes cosméticos, mezclas homogéneas de éstos o sistemas complejos como las emulsiones. Permite cuantificar los puntos de fusión y congelación de las gotas y los compuestos que hacen parte de la emulsión, así como detectar fenómenos de transferencia de masa entre varias fases o determinar la influencia de diferentes parámetros en su estabilidad [96,221].

Como ya se ha descrito durante el estudio de la adecuación de los productos biotecnológicos a las exigencias de los fabricantes de ingredientes cosméticos (Apartado 4.6.1.1), en primer lugar se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento térmico de los ésteres y el espermaceti puros a través de su análisis por DSC, obteniéndose los resultados gráficos que se pueden ver superpuestos en la Figura 4.45. Haciendo gala de su elevado grado de pureza, en dicha figura se puede apreciar que cada uno de los emolientes dio lugar a un termograma con un pico único y bien definido, que corresponde a su punto de fusión. Como era de esperar para los cuatro ésteres cetílicos, el valor de dicha temperatura es mayor conforme más larga es su longitud de cadena (Tabla 4.24), siendo prácticamente proporcional al número de carbonos que la conforma ($\mathbb{R}^2 = 0.9313$).



Figura 4.45- Termogramas superpuestos de los diferentes productos biotecnológicos y del emulsificante DUB 340.

Además, los valores del punto de fusión medidos para los ésteres cetílicos enzimáticos son muy similares a los descritos en la bibliografía [222–224], debiéndose las diferencias entre los datos principalmente al distinto grado de pureza de los compuestos, como en el caso de Vijayakumar et al. [224], en el que los ésteres fueron sintetizados con un exceso de alcohol

en el medio (relación molar 1.2:1). Cabe destacar asimismo, que tanto el laurato de cetilo como el palmitato biotecnológicos presentan puntos de fusión muy similares a los determinados en sus homólogos comerciales: 44.42 y 57.53 °C, respectivamente.

En cuanto al espermaceti, se puede observar que su punto de fusión, 49.5 °C, es inferior al de sus dos componentes principales, el miristato y el palmitato de cetilo, lo que podría poner en evidencia que pueden darse interacciones específicas entre las distintas especies dentro de la mezcla que "alteren" el valor de la temperatura de fusión esperada en base a su composición.

Asimismo, como se puede advertir en la Figura 4.45, ésta incluye el análisis por DSC del autoemulsionante DUB 340, ingrediente que dio lugar a un termograma con único pico de fusión amplio y relativamente poco definido, siendo un resultado congruente con su composición heterogénea.

	Temperatura de fusión (°C)			
Ingrediente	Ingrediente puro	Fase oleosa con emulsionante	Fase oleosa sin emulsionante	Emulsión
Laurato de cetilo	45.6	28.0	30.3	29.2 - 32.2 - 39.4
Miristato de cetilo	55.2	44.9	40.5	39.6 - 48.4
Palmitato de cetilo	57.6	46.7	44.4	45.7 - 50.0
Estearato de cetilo	62.2	51.7	51.2	51.7
Espermaceti	49.5	39.4	38.2	40.0
DUB 340	55.2			56.9

Tabla 4.24- Temperaturas de fusión registradas durante el análisis por DSC de diversas muestras que contienen los ésteres y el espermaceti biotecnológico.

Con el fin de determinar las interacciones existentes entre los compuestos biotecnológicos y el resto de los ingredientes que conforman la emulsión, también se analizaron las cremas por DSC. Los termogramas conseguidos, superpuestos en la Figura 4.46, muestran picos múltiples o distorsionados, que aparecen a temperaturas inferiores las determinadas para los ésteres puros. Sin embargo, estos resultados son habituales en el análisis de emulsiones por DSC, ya son el reflejo de la composición heterogénea de la muestra [221,225]. Debido a que los picos son más amplios y difusos, se produce un solapamiento de los rangos de fusión de las cremas y las diferencias entre ellas son menos obvias, como ocurre principalmente con la formulación que contiene espermaceti y las de sus dos compuestos mayoritarios. Asimismo, en el caso de los dos ésteres de menor longitud de cadena, el laurato y el miristato de cetilo, la presencia de diversos picos podría

deberse tanto a la coexistencia de diferentes estados de cristalización de algunos de los ingredientes presentes en la muestra, como a una distribución polidispersa de los tamaños de las gotas que constituyen la emulsión [221].

Por otra parte, en lo que concierne al termograma la emulsión control, se puede observar un pequeño pero amplio pico a 56.9 °C, debido al punto de fusión del emulsificante DUB 340 (Tabla 4.24). Este producto es un autoemulsionante compuesto por una mezcla de ingredientes compleja: un alcohol graso combinado con varios emulsificantes con distintos valores del HBL (balance hidrófilo – lipofílico). En consecuencia, el elevado grado de distorsión entre de los picos detectados durante el análisis térmico de las muestras, podría tener su origen en la interacción de los constituyentes del emulsificante con las distintas fases del sistema.



Figura 4.46- Termogramas superpuestos de las cremas formuladas con los diferentes productos biotecnológicos y la emulsión control.

En vista de estos resultados, se analizó la fase oleosa de la emulsión con y sin el emulsionante DUB 340, con los resultados recogidos en la Tabla 4.24. En ambos casos se obtuvieron picos únicos que mantienen el orden observado en el termograma de los compuestos puros, pero a menor temperatura y menos definidos. Puesto que el emulsionante actúa tanto en la fase oleosa como en la interfaz de las gotas de la emulsión, estos resultados no eximen al emulsificante de ser la principal causa del perfil térmico de las emulsiones, aunque no se puede despreciar la contribución de las interacciones entre las fases de la crema en los resultados obtenidos.

4.6.2.2. Estudio de la textura de las emulsiones: consistencia y firmeza.

Inicialmente empleado en el mundo de la alimentación, el análisis instrumental de la textura comenzó a utilizarse de forma regular en cosmética debido a que permite predecir de forma eficaz algunas de las propiedades sensoriales de una formulación. De este modo, a través de test mecánicos de compresión, penetración, extrusión o tensión, entre otros, esta técnica permite evaluar características como la consistencia, firmeza o cohesión de un cosmético, esenciales para la aceptación de un producto por los usuarios [93,226].

Puesto que los ensayos por DSC han demostrado que las propiedades térmicas de los ésteres cetílicos y el espermaceti en emulsión se ven afectadas por el medio que constituye la formulación y las interacciones entre sus ingredientes, en primer lugar se realizó un estudio de la textura de las cremas mediante ensayos de penetración a distintas temperaturas. A continuación se muestran los resultados de dichos análisis, en los que se refleja el valor positivo de la fuerza máxima (F+, Figura 4.47) y del área positiva bajo la curva (A+, Figura 4.48) cuando se representa la fuerza que debe hacer la sonda P/0.5R, descrita en el Apartado 3.1.2.5 de Materiales y métodos, frente al tiempo de duración del test de penetración. Estos parámetros son una medida de la fuerza y el trabajo que se debe realizar para penetrar una muestra, y han sido relacionados con la firmeza (en el caso de F+) y la consistencia (A+) de las cremas. En el análisis sensorial de cremas, la firmeza ha sido definida como la fuerza necesaria para comprimir completamente el producto entre los dedos [94], mientras que la consistencia está relacionada con el estado de agregación de los ingredientes que componen la muestra, es decir, si ésta es más o menos sólida [93]. Los detalles de cada uno de los ensayos realizados en esta sección se hallan en el Anexo IX.

Como se puede constatar, la presencia de los ésteres cetílicos y de la mezcla de éstos similar al espermaceti altera de forma significativa el comportamiento de las cremas durante los ensayos de penetración, especialmente si se compara con la emulsión control, cuyos valores de F+ y A+ son considerablemente inferiores a los del resto de muestras para temperaturas de hasta 40 °C (exceptuando en este último caso al laurato de cetilo).

Además, se presentan grandes diferencias en la fuerza y el área medias dependiendo del compuesto o la temperatura estudiada: por ejemplo, para el rango de 10 a 40 °C, el palmitato y el estearato de cetilo exhiben valores de F+ y A+ inferiores a los del miristato de cetilo, por lo que no se puede establecer una relación directa entre la longitud de cadena del éster y la firmeza y consistencia de la crema que lo contiene. No obstante, de forma general F+ y A+ siguen además una tendencia similar en su comportamiento térmico, disminuyendo con los aumentos de la temperatura. Esta observación se debe en gran medida a la fusión gradual de los componentes de la fase oleosa de la emulsión con la temperatura como queda demostrado por el hecho de que la mayor reducción de la firmeza y la consistencia de éstas se produce, especialmente para los ésteres de menor longitud de cadena, a temperaturas próximas al punto de fusión de dicha fase, determinado en los análisis por DSC.



Figura 4.47- Valor positivo promedio de la fuerza que ha de ejercer la sonda durante los ensayos de penetración a distintas temperaturas.



Figura 4.48- Valor positivo promedio del área bajo la curva medida durante los ensayos de penetración a distintas temperaturas.

Aunque no existe una relación directa entre los emolientes y su valor de la fuerza y el área experimental, los resultados representados en las Figuras 4.47 y 4.48 sí ponen de manifiesto que existe una relación estrecha entre la disminución de la firmeza y la consistencia con la longitud de cadena del éster. En la Tabla 4.25 se calcula el porcentaje en que se reducen F+ y A+ para el rango de temperaturas estudiado, a partir de la cual se puede constatar que la pérdida de estos atributos entre 10 y 50 °C es muy similar entre ambos y prácticamente proporcional al número de carbonos del laurato, miristato, palmitato y estearato de cetilo ($R^2 = 0.9265$ para F+ y $R^2 = 0.9336$ para A+). Por lo tanto, esta tabla hace evidente que la resistencia a la temperatura de las cremas se hace mayor conforme crece la longitud de cadena del éster que contiene, mientras que el espermaceti presenta una resistencia térmica intermedia entre sus dos componentes mayoritarios.

Ingrediente en la emulsión	Pérdida de firmeza, F+ (%)	Pérdida de consistencia, A+ (%)
Control	78.45	78.87
Laurato de cetilo	96.56	96.65
Miristato de cetilo	95.65	95.58
Palmitato de cetilo	88.22	87.95
Estearato de cetilo	84.95	84.12
Espermaceti	91.81	91.72

Tabla 4.25- Pérdida porcentual de firmeza y consistencia de las emulsiones cosméticas entre 10 y 50 °C.

Por otra parte, también se evaluó la firmeza y consistencia de las formulaciones de laurato y palmitato de cetilo comerciales y biotecnológicos a temperatura ambiente, registrando los datos que se muestran en la Tabla 4.26.

Tabla 4.26- Firmeza y consistencia de las emulsiones cosméticas elaboradas con laurato y palmitato de cetilo biotecnológico y comercial a temperatura ambiente.

Ingrediente en la emulsión		Firmeza, F+ (g)	Consistencia, A+ (g.s)
Laurato de cetilo	biotecnológico	39.04 ± 1.35	86.46 ± 1.67
	comercial	38.53 ± 0.47	86.51 ± 1.11
Palmitato de cetilo	biotecnológico	33.35 ± 1.65	79.38 ± 2.84
	comercial	59.76 ± 4.94	134.09 ± 13.59

Analizando los resultados presentados en esta tabla, resulta evidente la gran similitud entre las formulaciones realizadas con el laurato de cetilo comercial y el enzimático, mientras que para el palmitato, se detectan diferencias en los resultados según el origen de dicho compuesto. Esto podría deberse a la presencia de impurezas u otros compuestos en los ésteres empleados para elaborar las cremas; sin embargo, el elevado grado de similitud y definición de los picos de fusión de ambas muestras observados durante su análisis por DSC apunta a que las diferencias entre los valores de F+ y A+ para el palmitato de cetilo enzimático y comercial radican en la microestructura de la formulación más que en una diferencia de composición de los ingredientes.

4.6.2.3. Estudio de la textura de las emulsiones: extensibilidad.

Una de las propiedades más valoradas en una crema es la facilidad que tiene para ser aplicada sobre la piel, lo que puede ser evaluado a través de la medida de la fuerza necesaria para extender la emulsión a lo largo de un cierto recorrido. En la Figura 4.49, se muestran los valores promedio del área que queda bajo la curva al representar la fuerza ejercida para esparcir la crema a lo largo del tiempo de ensayo a temperatura ambiente, mientras que cada uno de los experimentos realizados se puede examinar con más detalle en el Anexo IX. De la observación de dicha figura resulta obvio que la presencia de los cuatro ésteres o del espermaceti aumenta considerablemente el trabajo a realizar para extender la crema en comparación con el ensayo realizado con la emulsión control. Estas observaciones hacen pensar que, tanto el espermaceti como sus ésteres, son especialmente indicados para formular cremas densas y de alta protección (tales como las "cold-cream" descritas en los Antecedentes), más que lociones fluidas tipo "body milk". Asimismo, centrándonos únicamente en las formulaciones que contienen los emolientes, no se aprecian diferencias representativas en la extensibilidad de estos cosméticos.



Figura 4.49- Valor promedio del área bajo la curva medida durante los ensayos de extensibilidad a temperatura ambiente.

Además, los resultados de la comparación entre las emulsiones que incluyen ésteres del ácido láurico y palmítico comercial y enzimático, no permiten establecer ninguna distinción clara según su origen, tal y como se puede ver en la Figura 4.50.



Figura 4.50- Valor promedio del área bajo la curva medida durante los ensayos de penetración a temperatura ambiente.

Por lo tanto, de los resultados aquí descritos, se puede concluir que la longitud de cadena del éster no es un parámetro que ejerza una influencia significativa en la extensibilidad de una crema, dentro del rango de muestras estudiado.

4.6.2.4. Análisis de la microestructura de las cremas: granulometría.

De los resultados del Apartado 4.6.2.2, es evidente que las diferencias en la consistencia y la firmeza de las cremas para una temperatura (baja) dada no se puede explicar únicamente en base a su composición, y el papel de su microestructura de la formulación no puede ser obviado a la hora de explicar sus propiedades de textura. En consecuencia, se determinó la distribución en volumen de las gotas que constituyen la fase dispersa de las emulsiones, representada en la Figura 4.51. En ella se puede ver que dicha distribución era, para todas las muestras, asimétrica y polidispersa. Concretamente, la emulsión control presentaba una distribución bimodal, mientras que la de laurato de cetilo resultaba ser aún más compleja, lo que parece estar en acuerdo con los resultados de los análisis por DSC de las cremas.

Por su parte, en la Tabla 4.27 se recopila la mediana del tamaño de partícula, denominada D50, el diámetro por debajo del cual se sitúa el 10% de la población (D10) y el diámetro por debajo del cual se sitúa el 90% de la población (D90), que también pueden ser consultados en el Anexo IX. Como se puede constatar para los cuatro ésteres, el diámetro D50 de las gotas de la fase dispersa de las formulaciones aumenta de la que contiene laurato de cetilo a palmitato de cetilo, para caer de nuevo para el estearato. Estos resultados, que parecen ser opuestos a las tendencias de F+ y A+ observadas en durante los ensayos de penetración a

10 y 20 °C, podrían poner en evidencia que las emulsiones con una microestructura más grosera podrían presentar una firmeza y consistencia inferior a las de las cremas compuestas de gotas más pequeñas. No obstante, esta hipótesis no debe tomarse estrictamente como un comportamiento general, puesto que en el caso de la crema de estearato de cetilo, ésta presenta un valor de D50 inferior a la de miristato de cetilo y los ensayos de penetración muestran que es menos consistente que la otra formulación que contiene el éster del ácido mirístico. Asimismo, mientras que la emulsión que contiene espermaceti posee una firmeza y consistencia similar a la de estearato de cetilo, su valor de D50 se acerca más al de la crema de miristato, pero en este caso la composición compleja de la mezcla de ésteres podría interferir en la relación entre los resultados del análisis de textura y el de granulometría.



Figura 4.51- Análisis granulométrico de las cremas, dispersión en volumen.

Ingrediente en la emulsión	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)
Control	0.87 ± 0.23	15.3 ± 2.3	45.3 ± 7.5
Laurato de cetilo	1.2 ± 0.4	12.7 ± 0.7	47.1 ± 1.1
Miristato de cetilo	3.7 ± 0.2	18.2 ± 1.0	47.8 ± 2.7
Palmitato de cetilo	6.5 ± 1.2	34.5 ± 0.5	72.5 ± 2.0
Estearato de cetilo	3.9 ± 0.2	13.7 ± 0.8	37.2 ± 1.2
Espermaceti	2.2 ± 0.1	17.3 ± 0.7	48.9 ± 3.5

Tabla 4.27- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de las emulsiones.
4.6.2.5. Análisis de la microestructura de las cremas: microscopía óptica.

Como complemento al estudio de la distribución del tamaño de gota de las muestras, las emulsiones fueron estudiadas uno, seis y nueve días después de su formulación, sin que se detectara la desestabilización de las mismas a lo largo del periodo de estudio. En la Figura 4.52 se reúnen varias fotografías de las emulsiones tomadas a los seis días de su elaboración, en las que se puede ver que, como ha sido puesto en evidencia mediante los análisis granulométricos, las cremas presentan una microestructura heterogénea, en la que se puede encontrar una amplia variedad de formas y tamaños de gota en la fase dispersa.



Figura 4.52- Micrografía óptica de las emulsiones control (a), de laurato de cetilo (b), miristato de cetilo (c), palmitato de cetilo (d), estearato de cetilo (e) y espermaceti (f) con un aumento de G x 200. La barra blanca representa 100 μm.

Como se puede observar, el examen microscópico de las muestras también revela diferencias entre las cremas, que exhiben diferentes tipos de cristalizaciones y estados de agregación. A pesar de que no resulta clara la conexión con la longitud de cadena del éster cetílico, la Figura 4.52 permite afirmar que cada uno de estos compuestos implica una microestructura específica de la emulsión, lo que depende no sólo del tamaño de la molécula, sino también de su organización espacial y simetría. En este sentido, curiosamente es el palmitato de cetilo, formado por un ácido y un alcohol saturado y lineal de 16 átomos de carbono cada uno, es el que mayor D50 y menor firmeza y consistencia demostraba de todos.

En lo que respecta a las emulsiones que contienen los dos ésteres adquiridos en el mercado, en la Figura 4.53 se puede ver que presentan estructuras semejantes a las de sus homólogos enzimáticos, poniendo en evidencia que todas las conclusiones extraídas previamente son fruto de la conformación del éster en el espacio, independientemente de cuál sea su origen.



Figura 4.53- *Micrografía óptica de las emulsiones de laurato de cetilo (a) y palmitato de cetilo (b) comerciales con un aumento de G x 200. La barra blanca representa 100 µm.*

4.7. Estudio económico del proceso de esterificación a escala de laboratorio.

A pesar de que actualmente existe el conocimiento necesario para llevar a cabo un amplio abanico de reacciones catalizadas enzimáticamente, de cara a su aplicación industrial el rendimiento y el precio de los derivados inmovilizados son factores limitantes para su implantación real en los procesos productivos más allá de los de química fina. En este sentido, la comunidad científica está haciendo grandes esfuerzos para lograr reducir el coste de los derivados inmovilizados, garantizando asimismo que posean un elevado grado de actividad y una estabilidad adecuada a medio y largo plazo bajo las condiciones en las que operan los biorreactores [227].

A continuación se aborda una estimación económica del coste del proceso de síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas, que está compuesto por:

- El gasto en los reactivos de la síntesis, que está condicionado por las proporciones necesarias para la obtención de un análogo del espermaceti natural.
- El coste energético del proceso de síntesis.
- La inversión inicial en biocatalizador, que se verá más o menos amortizada por el número de reutilizaciones posibles para cada uno de ellos.

En lo que concierne al coste del biocatalizador, se ha de tener en cuenta que, en el caso los derivados inmovilizados comerciales, éste depende de su precio en el mercado, pero que para los biocatalizadores propios se ha de considerar el coste completo de inmovilizar la disolución de lipasa B de *Candida antarctica* sobre los diferentes soportes estudiados. Esto engloba no sólo el precio Lipozyme[®] CALB L y las matrices poliméricas, sino también el de los reactivos y el consumo energético de la inmovilización.

Cabe destacar además, que en este análisis económico no se ha tenido en cuenta la inversión inicial en equipos y material de laboratorio no fungible.

4.7.1. Cálculo del coste de operación de los equipos.

Como se acaba de explicar, para llevar a cabo un estudio económico fiable, resulta imprescindible hacer una estimación del coste derivado del consumo energético de los distintos equipos empleados tanto para inmovilizar enzimas (criostato, agitador orbital y bomba peristáltica) como para la síntesis (baño termostático, controlador del reactor, agitación, generación de N_2 y bomba de vacío).

Para ello, empleando un amperímetro, se ha medido la intensidad de la corriente que recorre los equipos tanto en su puesta en marcha, como durante el mantenimiento de las condiciones del proceso. Considerando que la corriente eléctrica doméstica es suministrada con un tensión de 220 V y el precio de la electricidad según la Comisión Nacional del

Mercado y la Competencia en el momento que fueron realizadas las medidas [228], igual a 0.2086 €/kWh, se ha calculado el gasto energético promedio al emplear estos equipos. Dichos cálculos se hallan en el Anexo X y su resultado se resume en la siguiente tabla.

Equipo	Tarea	Intensidad (A)	Potencia (W)	Coste (€/min)
Agitador orbital	Activación	0.10	24	0.0001
Bomba peristáltica	Inmovilización	0.02	5	0.00002
	Enfriamiento inicial	1.60	352	0.0012
Criostato	Mantenimiento temperatura inmovilización	2.32	515	0.0016
Baño del reactor	Calentamiento inicial	8.50	1870	0.0065
	Mantenimiento temperatura reacción	2.40	527	0.0018
Generador de	Generación inicial	4.50	990	0.0034
nitrógeno	Mantenimiento caudal N ₂ reacción	4.50	990	0.0034
Agitación, Reactor y control del proceso, bomba de vacío mantenimiento de la presión en el reactor		0.30	0.0138	0.0002

Tabla 4.28- Valores promedio del coste de operación de los equipos utilizados para la obtención del espermaceti biotecnológico.

El gasto energético será pues la suma de la energía requerida para alcanzar las condiciones de trabajo más la consumida durante el tiempo que el proceso que se esté llevando a cabo. Por lo tanto, para cada uno de los procesos de síntesis se ha seleccionado como tiempo de operación el necesario para alcanzar una conversión del 98% bajo condiciones de óptimas, y es el que se refleja en la Tabla 4.29. Éste tiempo ha sido determinado empleando la ecuación cinética de pseudo-primer orden propuesta para cada uno de los casos, dado que permite la descripción del proceso de síntesis de espermaceti con un buen grado de ajuste (Apartado 4.4.3.1).

Asimismo, cabe destacar que en lo que respecta a la inmovilización de Lipozyme[®] CALB L, la duración de la activación y del proceso de unión de la enzima al soporte es independiente del soporte utilizado.

Biocatalizador	CalB immo Plus	Novozym [®]	435 Lipozymo	e [®] RM IM L	ipozyme [®] TL IM
Tiempo para conversión del 98% (min)	52.6	50.9	6	1.2	102.4
Biocatalizador	Lewatit A	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 N	A ECR 8285 M
Tiempo para conversión del 98% (min)	77.5	57.0	68.4	60.1	55.6

Tabla 4.29- Tiempo requerido por cada biocatalizador para alcanzar un conversión del 98% en la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas.

4.7.2. Coste de la síntesis de espermaceti empleando biocatalizadores comerciales.

Una de las principales ventajas de la adquirir enzimas previamente inmovilizadas sobre un soporte, es el ahorro del tiempo necesario para elaborar y aplicar un protocolo de inmovilización viable y eficaz, aunque ello provoque que el coste del proceso se vea supeditado al precio con el que el biocatalizador sea comercializado por la empresa productora. En consecuencia, para la elaboración del estudio económico del proceso de síntesis de espermaceti, el coste energético del proceso de inmovilización se verá sustituido por el precio de los biocatalizadores CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM, cuyo valor se puede consultar en la Tabla 4.30.

Biocatalizador	Masa de biocatalizador óptima (g)	Precio del biocatalizador (€/kg)	Coste del biocatalizador (€)
CalB immo Plus	0.5	1600	0.80
Novozym [®] 435	0.5	1300	0.65
Lipozyme [®] RM IM	0.5	600	0.30
Lipozyme [®] TL IM	1	70	0.07

Tabla 4.30- Coste del biocatalizador requerido para llevar a cabo la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas.

Por lo tanto, si al coste del biocatalizador le sumamos el de la energía consumida hasta alcanzar una conversión del 98% y el de los reactivos (~0.82 €), cuyo cálculo se encuentra detallado en el Anexo X, se obtiene el coste del proceso de obtención de 20 g de espermaceti a escala de laboratorio. En la Figura 4.54 se ha representado de forma gráfica este coste total así como la contribución a éste del coste de la energía, sustratos y biocatalizador, en tanto por ciento. Como se puede observar, a pesar de ser el biocatalizador que mayores limitaciones técnicas presenta, el proceso más rentable de todos es la obtención de espermaceti con Lipozyme[®] TL IM debido al bajo precio del biocatalizador. Por el motivo contrario, el elevado coste de los derivados de CalB, casi 20 veces más caros que el de TII, hace que llevar a cabo la síntesis con CalB immo Plus y Novozym[®] 435 resulte más costoso, aunque se necesite la mitad de biocatalizador y de tiempo para completar el proceso.

Como se puede observar, el coste de los reactivos supone aproximadamente entre el 43 y el 62% del coste del proceso, lo que se debe mayoritariamente a que estos son de grado analítico y para su uso en investigación.



Figura 4.54- Coste del proceso de síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas con los biocatalizadores comerciales.

Tanto los datos de la Tabla 4.30 como de la Figura 4.54 están basados en el cálculo de los costes para un único uso de los biocatalizadores. No obstante, como se ha destacado en diversos puntos de este trabajo, el coste de los procesos biocatalíticos se puede reducir a través de la reutilización de los derivados inmovilizados en varios ciclos de reacción, por lo que se ha vuelto a llevar a cabo dichos cálculos considerando que cada uno de estos productos comerciales puede utilizarse un mínimo de 15 veces sin pérdida de actividad.

En la Tabla 4.31 se compara la contribución del coste del biocatalizador teniendo en cuenta o no sus reutilizaciones. Como se puede apreciar, la posibilidad de ser empleado en

varios ciclos consecutivos permite amortizar enormemente la inversión que se ha de hacer en éste, y el precio del biocatalizador por uso supone entre un 6.6 y un 7.1% del inicial.

Diagotalizadar	Contribución al coste total (€)			
biocatalizador —	un uso	reutilizado		
CalB immo Plus	0.80	0.053		
Novozym [®] 435	0.65	0.043		
Lipozyme [®] RM IM	0.30	0.020		
Lipozyme [®] TL IM	0.07	0.005		

Tabla 4.31- Comparación del coste del biocatalizador requerido para llevar a cabo la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas si se consideran sus reutilizaciones.

En la Figura 4.55 se representa de nuevo el coste total de la síntesis de 20 g de espermaceti bajo condiciones óptimas y la contribución del precio de la energía, los sustratos y el biocatalizador cuando se tiene en cuenta el número de reutilizaciones viables de éste. Como se puede ver, el peso del precio del biocatalizador en el coste total se ha reducido notoriamente, siendo prácticamente irrelevante para el derivado de Tll. No obstante, este hecho es especialmente beneficioso para los procesos llevados a cabo con los biocatalizadores más caros, los de CalB, que reducen casi diez veces su contribución al coste total del proceso.



Figura 4.55- Coste del proceso de síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas con los biocatalizadores comerciales teniendo en cuenta su capacidad de ser reutilizados.

De la observación de esta figura resulta evidente el enorme impacto que la reutilización del biocatalizador tiene sobre el coste global del proceso de síntesis, que se ha visto reducido entre un 4.9 (para Lipozyme[®] TL IM) y un 39.1% (en el caso de CalB immo Plus). El análisis de los resultados bajo este enfoque conlleva que ahora el peso del coste del biocatalizador ya no resulte tan relevante frente a los requerimientos energéticos que entraña utilizar un catalizador enzimático con menores aptitudes técnicas para la síntesis solvent-free de la mezcla de ésteres cetílicos. En este sentido, cabe destacar que para los derivados inmovilizados de CalB y Rml el coste energético se halla en torno al ~25% del total, pero en el caso de Lipozyme[®] TL IM es casi diez unidades porcentuales mayor.

De este modo, mientras que para un uso puntual el derivado inmovilizado comercial más rentable era el de Tll, a medio y largo plazo la síntesis de espermaceti con Lipozyme[®] TL IM conlleva una mayor inversión económica. El equilibrio entre el gasto en energía y en biocatalizador hacen de la síntesis con Lipozyme[®] RM IM el proceso más económico de todos, seguida, por unos pocos céntimos de euro de diferencia, del catalizado con Novozym[®] 435.

4.7.3. Coste de la síntesis de espermaceti empleando derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L.

4.7.3.1. Determinación del coste de la inmovilización.

En el caso de los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio, para poder determinar el coste global del proceso de obtención de espermaceti bajo condiciones óptimas, será necesario calcular el coste de la propia inmovilización. Éste será la suma del gasto en:

- Lipozyme[®] CALB L, que es comercializado con un precio de 96 €/L,
- los soportes de inmovilización, cuyos precios se presentan en la Tabla 4.32,
- los reactivos, es decir, el coste de elaborar el tampón fosfato, y de la disolución de etanol en el caso de la inmovilización por adsorción,
- la energía requerida para el proceso, derivada del proceso de activación de 12 h y el de inmovilización, de 72 h (el secado del biocatalizador es despreciable).

Soporte	Precio (€/kg)
Lewatit	254
Amberlite	202
ECR 1090 M	572
ECR 8806 M	572
ECR 8285 M	1120

Tabla 4.32-	Precios d	le los s	oportes	de in	moviliza	ción em	pleados.
	I recros c		oponies		110 1112,00		neuros.

Como se puede comprobar en la Tabla 4.32, el elevado coste de las matrices poliméricas empleadas en la inmovilización supone una gran desventaja de partida para hacer frente al precio de los biocatalizadores comerciales.

Si consideramos que en cada inmovilización se realiza para dos lotes de 5 g de soporte, es decir, que se inmoviliza sobre un total de 10 g de soporte húmedo iniciales, el precio del biocatalizador resulta ser el reflejado en la Tabla 4.33. Los cálculos realizados se encuentran con más detalle en el Anexo X. Observando los resultados recogidos en esta tabla, es obvio que, proporcionalmente, elaborar el derivado de ECR 8285 M requiere una mayor inversión económica que en el resto de casos, lo que es debido al precio de la resina y a que su elevado contenido en agua hace que la cantidad de biocatalizador recuperado al final sea baja. Por el contrario, Lewatit ofrece el proceso más económico, poniendo en evidencia la gran influencia de estas variables en el coste final del biocatalizador.

En lo que respecta al consumo de energía, éste puede suponer entre el 33 y el 60% del coste de la inmovilización, lo que se debe a que el hecho de llevar a cabo el proceso a escala de laboratorio no permite amortizar la energía empleada para mantener la disolución de enzima refrigerada durante el proceso de inmovilización, que dentro de esta escala, sería la misma independientemente de si duplicamos o triplicamos la cantidad de biocatalizador preparado por inmovilización. Cabe destacar asimismo que el coste de los reactivos es casi despreciable independientemente del protocolo de inmovilización estudiado, ya que representa menos del 3% del total.

Soporte	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
Coste enzima (€)	2.40	2.40	2.40	2.40	2.40
Coste soporte (€)	2.54	2.02	5.72	5.72	11.2
Coste reactivos (€)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.13
Coste energía (€)	6.86	6.86	6.86	6.86	6.86
Derivado seco recuperado (g)	4.79	4.47	3.95	5.06	3.37
Coste inmovilización (€/g)	2.54	2.60	3.88	3.03	6.11

Tabla 4.33- Coste de la inmovilización de Lipozyme[®] CALB L.

4.7.3.2. Determinación del coste de la obtención de espermaceti.

Una vez conocida la inversión económica que se ha de hacer para obtener los diferentes derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L, es posible determinar el coste de sintetizar 20 g de espermaceti bajo condiciones óptimas. Para ello, en vista de los resultados expuestos para los biocatalizadores comerciales, en primer lugar se ha calculado el coste asociado al consumo de biocatalizador, teniendo en cuenta su capacidad para ser reutilizados (Tabla 4.34). Como se puede constatar, la mayor actividad de los catalizadores enzimáticos desarrollados en el laboratorio y su estabilidad operacional hacen que el coste de emplear Amberlite y ECR 8806 M sea similar al de algunos de los biocatalizadores comerciales. No obstante, ya sea por su escasa estabilidad mecánica (Lewatit y ECR 1090 M) o por el elevado coste de su obtención (ECR 1090 M y ECR 8285 M), el coste del resto de derivados supone entre 3.1 y 6.4 veces más que trabajar con ECR 8806 M.

Biocatalizador	Masa de biocatalizador óptima (g)	Reutilizaciones viables	Precio del biocatalizador (€/g)	Coste del biocatalizador (€)
Lewatit	0.5	5	2.54	0.254
Amberlite	0.5	15	2.60	0.087
ECR 1090 M	0.25	3	3.88	0.324
ECR 8806 M	0.25	15	3.03	0.051
ECR 8285 M	0.25	10	6.11	0.153

Tabla 4.34- Coste del biocatalizador requerido para llevar a cabo la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas.

De forma análoga a la llevada a cabo con los biocatalizadores comerciales, si se suma el coste del biocatalizador, el de la energía consumida hasta alcanzar una conversión del 98% y el de los reactivos (consultar el Anexo X para más detalle), se obtiene el coste del proceso de síntesis de espermaceti en un medio libre de disolventes optimizado a escala de laboratorio. El coste total y la contribución de cada uno de los costes parciales se muestran en la Figura 4.56, en la que resulta evidente que el precio de los sustratos es el que contribuye mayormente al coste del proceso, mientras que la optimización del proceso de síntesis hace que el coste de la energía suponga alrededor de una cuarta parte del coste total. Por lo tanto, el precio de los derivados de Lipozyme[®] CALB L resulta ser el elemento diferenciador entre un proceso y otro, de modo que el coste de los derivados Lewatit, ECR 1090 M y ECR 8285 M, supone, en el peor de los casos, multiplicar hasta cinco veces la contribución de éstos al coste total.

A pesar de que el coste de la inmovilización sobre Lewatit es el más bajo de los estudiados (Apartado 4.7.3.1), en lo que respecta a los costes globales, la necesidad de emplear una mayor cantidad de biocatalizador en la síntesis y su escasa estabilidad operacional hacen de la obtención de espermaceti con Lewatit el proceso menos rentable de todos junto al catalizado por ECR 1090 M. En contraposición, aunque las resinas de Purolite

son las más caras, los buenos resultados técnicos del biocatalizador hacen de la síntesis con ECR 8806 M el proceso proporcionalmente menos costoso. Así pues, el coste de la síntesis biocatalítica de espermaceti, a escala de laboratorio, empleando dicho derivado inmovilizado es de 0.0587 €/g mientras que el coste del proceso optimizado con Lipozyme[®] RM IM, el más económico entre los biocatalizadores comerciales, es de 0.0573 €/g. Por lo tanto, se puede afirmar que el proceso catalizado por CalB inmovilizada por adsorción sobre ECR 8806 M representa una solución tan apta, desde un punto de vista técnico y económico, para la síntesis de espermaceti en un proceso solvent-free como los biocatalizadores comerciales. Es más, se ha de recordar que el proceso de inmovilización no ha sido optimizado para el caso concreto de este soporte, por lo que aún cabría la posibilidad de reducir los costes de trabajar con el derivado de Lipozyme[®] CALB L.

Resulta además digno de mención el caso de los biocatalizadores elaborados con Amberlite e, incluso, ECR 8285 M, en los que el equilibrio entre su capacidad para ser reutilizados y la cantidad de biocatalizador requerida para la síntesis (una consecuencia directa de su actividad) hacen que sean potencialmente competitivos con los derivados comerciales.



Figura 4.56- Coste del proceso de síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas con los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L teniendo en cuenta su capacidad de ser reutilizados.



5. Conclusiones

5. Conclusiones.

De los resultados experimentales expuestos a lo largo de esta Tesis Doctoral, se pueden extraer las conclusiones expuestas a continuación.

- 1. A partir de los experimentos previos realizados a presión atmosférica con los biocatalizadores comerciales se puede deducir que:
- 1.1. Comparado con el proceso de síntesis en un reactor abierto a la atmósfera, trabajar bajo condiciones de atmósfera inerte y presión reducida mejora la velocidad de reacción, conduce a un mayor valor de la conversión y reduce el número ácido del producto final. Además, el reactor de altas prestaciones permite una mayor repetitividad de los resultados.
- 1.2. No se ha detectado fenómenos de desorción de la lipasa inmovilizada en los derivados comerciales.
- 2. Durante la optimización de la concentración de biocatalizador comercial en el medio de reacción se ha puesto en evidencia que:
- 2.1. Es viable sintetizar los ésteres cetílicos del espermaceti empleando los derivados inmovilizados comercializados como CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM.
- 2.2. Se pueden alcanzar conversiones finales similares durante el proceso de esterificación utilizado diferentes concentraciones de biocatalizador, requiriéndose menores tiempos de operación para las mayores cantidades de derivado inmovilizado estudiadas. No obstante, esta mejora de la velocidad de síntesis no es proporcional a la concentración de biocatalizador en el medio de reacción.

- 2.3. A pesar de que un incremento de la longitud de cadena del éster sintetizado entraña una menor velocidad de reacción, a efectos prácticos es la concentración de biocatalizador la que determina el tiempo necesario para que el proceso de esterificación alcance el equilibrio químico.
- 2.4. La cantidad óptima para los biocatalizadores comerciales elaborados con lipasa B de *Candida antarctica* y lipasa de *Rhizomucor miehei* es 0.5 g, mientras que para Lipozyme[®] TL IM es 1 g, ya que este derivado presenta una menor actividad que el resto por el carácter hidrófilo de su soporte y por la especificidad de *Thermomyces lanuginosus*.
- 3. Como resultado del estudio de la influencia de la temperatura en la síntesis de espermaceti con los biocatalizadores comerciales, se puede concluir que:
- 3.1. CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM y Lipozyme[®] TL IM son capaces de llevar a cabo de forma satisfactoria la síntesis de espermaceti en un medio en ausencia de disolventes y en una sola etapa.
- 3.2. Un aumento de la temperatura del proceso conlleva una mejora de la velocidad de reacción, dentro del rango estudiado, para los derivados inmovilizados de lipasa B de *Candida antarctica* y lipasa de *Rhizomucor miehei*. Sin embargo trabajar por encima de 70 °C no supone una mejora para el proceso catalizado por el derivado de *Thermomyces lanuginosus*, lo que pone de manifiesto que dicha enzima es menos resistente a la temperatura.
- 3.3. 70 °C ha sido elegida como la temperatura óptima para los procesos de síntesis biocatalítica empleando los inmovilizados comerciales, ya que una mayor temperatura de proceso implica un mayor consumo de energía y a que cuando se trabaja a 60 °C se requieren mayores tiempos de acondicionamiento de los reactivos.
- 4. Los resultados observados durante el estudio de la estabilidad operacional de los biocatalizadores comerciales apuntan a que presentan unas características adecuadas para ser utilizados en la síntesis de espermaceti a escala industrial, ya que éstos fueron recuperados y utilizados en una nueva síntesis hasta 15 veces.
- 5. Del proceso de inmovilización de Lipozyme[®] CALB L sobre Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M se puede deducir que:
- 5.1. Los protocolos de inmovilización escogidos para la inmovilización de Lipozyme[®] CALB L en las resinas macroporosas estudiadas permiten que el proceso se lleve a cabo, ya sea por adsorción o por enlace covalente, con buenos rendimientos de inmovilización y una carga enzimática elevada sobre el soporte.

- 5.2. Los resultados de la inmovilización en las resinas Lewatit, Amberlite y ECR 1090 M ponen de manifiesto que la lipasa B de *Candida antarctica* posee una gran afinidad por las matrices de poliestireno, y que diámetros de poro inferiores a 300 400 Å resultan ser un factor limitante a la hora de inmovilizar dicha enzima.
- 5.3. De la comparación de los resultados de la inmovilización sobre ECR 8806 M con los de Amberlite, se puede afirmar que una gran área superficial del soporte favorece la adsorción de la lipasa estudiada y la obtención de biocatalizadores con una elevada carga enzimática.
- 6. Durante el estudio de la desorción de la lipasa contenida en los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L en un reactor abierto a la atmósfera, ha sido posible detectar una actividad residual de la enzima en el medio de reacción, lo que probablemente se deba a un proceso de lavado del biocatalizador insuficiente tras la inmovilización de la lipasa.
- 7. Como resultado de los experimentos realizados con el fin de optimizar la concentración de derivado inmovilizado de Lipozyme[®] CALB L en el medio de reacción, se llegó a las siguientes conclusiones:
- 7.1. Los biocatalizadores elaborados con Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M son capaces de catalizar el proceso de esterificación de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico con el alcohol cetílico.
- 7.2. Al igual que con los derivados inmovilizados comerciales, es posible mejorar la velocidad del proceso aumentando la cantidad de biocatalizador en el medio de reacción, pero dicho incremento de la velocidad no se produce de forma proporcional a la cantidad de derivado enzimático empleada.
- 7.3. Un incremento del diámetro de poro del biocatalizador, dentro del rango estudiado para los derivados inmovilizados sobre matrices de poliestireno, implica una mayor velocidad de reacción, puesto que se favorecen los procesos de difusión en el soporte.
- 7.4. La composición química del soporte es otro parámetro a considerar durante el diseño de un biocatalizador para la síntesis de este tipo de ésteres, ya que los ensayos realizados con el derivado de ECR 8806 M demuestran que el metacrilato de octadecilo es un polímero más adecuado que el poliestireno para dicho propósito.
- 7.5. El protocolo seguido para la inmovilización de lipasa B de *Candida antarctica* por enlace covalente sobre ECR 8285 M, permite la unión de la enzima al soporte sin pérdidas significativas de su actividad.

- 7.6. Se ha seleccionado 0.5 g como cantidad óptima de los derivados inmovilizados sobre Lewatit and Amberlite y 0.25 g para los biocatalizadores de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M.
- 8. Durante la optimización de la temperatura del proceso de obtención espermaceti cuando se utiliza Lipozyme[®] CALB L inmovilizada se ha observado que:
- 8.1. Es posible llevar a cabo la síntesis simultánea de los ésteres cetílicos con unas proporciones similares a las del espermaceti natural utilizando los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio.
- 8.2. La velocidad de reacción se ve favorecida con la temperatura dentro del rango estudiado, de forma que se ha seleccionado 70 °C como temperatura óptima en todos los casos.
- 9. Los biocatalizadores de Lipozyme[®] CALB L demostraron tener una buena estabilidad al almacenamiento, manteniendo su actividad catalítica intacta al menos durante 12 meses después de su inmovilización. No obstante, sólo los derivados inmovilizados sobre Amberlite y ECR 8806 M exhibieron una estabilidad operacional adecuada durante su uso en 15 ciclos consecutivos, lo que probablemente se deba a la naturaleza y grado de entrecruzamiento del polímero que constituye dichos soportes.
- 10. En vista de la estabilidad mecánica de Lewatit, ECR 1090 M y ECR 8285 M, se realizó la síntesis de espermaceti empleando velocidades de agitación inferiores a 350 rpm, demostrándose que es posible conseguir un buen grado de mezcla a partir de 250 rpm.
- 11. Comparando Novozym[®] 435 con los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L de forma que en el medio de reacción haya la misma cantidad de enzima, se puede concluir que los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio poseen una mayor actividad específica que el comercial. Dicha observación se debe a la mayor hidrofobicidad de los soportes estudiados respecto al empleado en la elaboración de Novozym[®] 435.
- 12. De acuerdo con los resultados del estudio cinético del proceso de esterificación, se puede aseverar que:
- 12.1. La etapa controlante de la síntesis de los ésteres cetílicos y del blanco de ballena es la transferencia externa de materia, de forma que dicho proceso puede describirse con un buen grado de ajuste a través de un modelo de pseudo-primer orden.

- 12.2. El valor inverso del coeficiente cinético global del proceso, k_r , es proporcional, entre otros factores, al inverso de la cantidad de biocatalizador presente en el medio de reacción.
- 12.3. Los valores del coeficiente cinético, calculados en base a los resultados de los ensayos a distintas temperaturas, siguen la ecuación de Arrhenius.
- 12.4. La velocidad de reacción del proceso de síntesis del espermaceti en una sola etapa puede predecirse con bastante exactitud a partir de las constantes cinéticas globales determinadas para cada uno de los ésteres cetílicos bajo las mismas condiciones experimentales.
- 13. Durante la evaluación de los compuestos enzimáticos como ingredientes cosméticos se ha comprobado que:
- 13.1. Los ésteres cetílicos y el espermaceti sintetizados por vía biocatalítica presentan propiedades fisicoquímicas similares a los actualmente comercializados, obtenidos mediante rutas químicas clásicas.
- 13.2. Como se ha demostrado mediante el análisis por HPLC de una muestra intermedia, durante la obtención de espermaceti en una sola etapa, los ésteres se sintetizan simultáneamente y con una composición similar a la deseada en el producto final.
- 13.3. Tanto los ésteres como el espermaceti enzimáticos poseen un alto grado de pureza, de forma que no es posible detectar la presencia de subproductos o sustratos sin reaccionar mediante el análisis por HPLC y DSC de los productos finales.
- 13.4. Las emulsiones cosméticas formuladas empleando los ingredientes biotecnológicos poseen una microestructura heterogénea, de forma que las gotas que componen la fase discontinua presentan una amplia variedad de tamaños, determinados por granulometría. El examen las cremas mediante microscopía óptica confirma dichas observaciones, así como diferencias en la apariencia de las emulsiones, en las que se puede ver la presencia de cristales y distintos niveles de agregación.
- 13.5. El perfil térmico de las cremas que contienen los productos enzimáticos, obtenido por DSC, depende tanto del emoliente utilizado en la formulación, como de la estructura de la propia emulsión y de las interacciones entre los ingredientes que la componen.
- 13.6. La consistencia y firmeza de las emulsiones, determinadas a través de ensayos de penetración a diferentes temperaturas, son propiedades de textura que disminuyen con la temperatura, debido en gran medida a la fusión gradual de los ésteres cetílicos y del espermaceti incluidos en la formulación.
- 13.7. La firmeza y la consistencia de las cremas que contienen los ésteres enzimáticos con mayor longitud de cadena son las menos afectadas por las variaciones de la

temperatura, ya que este tipo de ésteres les confieren una mayor estabilidad y resistencia a los cambios térmicos.

- 13.8. Aunque el comportamiento térmico de las cremas depende en gran medida de su composición, el efecto de la microestructura de la emulsión no puede ser obviado.
- 13.9. La aplicación como ingredientes cosméticos del laurato y el palmitato de cetilo no permite establecer ninguna distinción evidente en base su origen, comercial o enzimático.
- 14. A través de la evaluación económica de la síntesis de espermaceti a escala de laboratorio bajo condiciones óptimas, se concluye que:
- 14.1. La suma de consumo de energía y del precio del soporte suponen entre el 73 y el 85% del coste de la inmovilización, independientemente del protocolo utilizado, aunque dicho coste podría reducirse a través de un aumento de la escala del proceso.
- 14.2. La capacidad de los biocatalizadores para ser reutilizados en varios ciclos de reacción, y por consiguiente, su estabilidad operacional, es un parámetro de gran influencia en el coste total de la producción enzimática de espermaceti.
- 14.3. La utilización de un biocatalizador más barato no implica una reducción del coste global de la síntesis, ya que dicho coste dependerá del equilibrio entre el precio del derivado inmovilizado, la cantidad de éste necesaria para llevar a cabo el proceso y su estabilidad.
- 14.4. La síntesis de espermaceti empleando Lipozyme[®] RM IM es la más rentable de entre los procesos catalizados por los derivado inmovilizados comerciales, mientras que, de entre los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio, es el elaborado con ECR 8806 M el que conlleva un menor coste del proceso.
- 15. En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado la posibilidad de obtener por vía biocatalítica y en una sola etapa de un producto con una composición similar al espermaceti natural, una sustancia con numerosas aplicaciones en el campo de la cosmética. Con el propósito final de ser implantado a nivel comercial, dicho proceso se encuentra optimizado y listo para ser llevado a una etapa intermedia de escalado, y este trabajo constituye una base sólida para la puesta a punto de la síntesis enzimática de otros muchos ésteres de utilidad en la industria cosmética.



6. Bibliografía

6. Bibliografía.

- 1 Holthuis L. The Scientific Name of the Sperm Whale. *Mar. Mamm. Sci.* 1987; **3**: 87–88; DOI:10.1111/j.1748-7692.1987.tb00154.x.
- 2 Schevill W. The Scientific Name of the Sperm Whale Reply. *Mar. Mamm. Sci.* 1987; **3**: 89–90; DOI:10.1111/j.1748-7692.1987.tb00155.x.
- 3 CRAM. Fundación para la conservación y recuparación de animales marinos. Cachalote (*Physeter Macrocephalus*). https://cram.org/catalogo-de-especies/mamiferos-marinos/cetaceos/cachalote/ (consultado el 18 de octubre 2016).
- 4 Whitehead H. Estimates of the Current Global Population Size and Historical Trajectory for Sperm Whales. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 2002; **242**: 295–304; DOI:10.3354/meps242295.
- 5 Rice DW. Spermaceti. In *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*, William F. Perrin BW, J.G.M. Thewissen (eds). Academic Press: London, 2009; 1098–1099.
- 6 Clarke M. Structure and Proportions of Spermaceti Organ in Sperm Whale. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1978; **58**: 1–17.
- 7 Carlier A, Miet C, Puisieux F, Lehir A. Analysis of Ointments. 8.Study of Composition of Spermaceti and of Synthetic Spermaceti. *Ann. Pharm. Fr.* 1970; **28**: 487–496.
- 8 Trends en español. La Novela de Moby Dick Puede Haber Sido Más Real de Lo Que Creíamos. http://trendsespanol.com/2016/04/08/la-novela-de-moby-dick-puede-haber-sido-mas-real-de-lo-que-creiamos/ (consultado el 1 de diciembre 2016).

- 9 Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico de la Universidad de Salamanca. Cetaceo-ballena. http://dicciomed.eusal.es/lexema/cetaceo-ballena (consultado el 18 de octubre 2016).
- 10 Carrier DR, Deban SM, Otterstrom J. The Face That Sank the Essex: Potential Function of the Spermaceti Organ in Aggression. *J. Exp. Biol.* 2002; **205**: 1755–1763.
- 11 Clarke MR. Function of the Spermaceti Organ of the Sperm Whale. *Nature*. 1970; **228**: 873–874; DOI:10.1038/228873a0.
- 12 Madsen PT, Payne R, Kristiansen NU, Wahlberg M, Kerr I, Møhl B. Sperm Whale Sound Production Studied with Ultrasound Time/Depth-Recording Tags. *J Exp Biol.* 2002; **205**: 1899–1906.
- 13 Møhl B, Wahlberg M, Madsen PT, Heerfordt A, Lund A. The Monopulsed Nature of Sperm Whale Clicks. J. Acoust. Soc. Am. 2003; 114: 1143–1154; DOI:10.1121/1.1586258.
- 14 Møhl B. Sound Transmission in the Nose of the Sperm Whale *Physeter Catodon*. A Post Mortem Study. *J Comp Physiol A*. 2001; **187**: 335–340; DOI:10.1007/s003590100205.
- 15 García Martín T. Estudio Fenomenológico y Modelado Cinético de La Síntesis Enzimática de Ésteres de Bajo, Medio y Alto Peso Molecular. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid: Madrid, 1995.
- 16 Stevenson CH. Aquatic Products in Arts and Industries. Fish Oils, Fats, and Waxes. Fertilizers from Aquatic Products. Report of the Commissioner of Fish and Fisheries, 1902.
- 17 Reeves RR. Marine Mammals, History of Exploitation. In *Marine Policy & Economics: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences*, Steele JH, Thorpe SA, Turekian KK (eds). Academic Press: London, 2010.
- 18 Aron W, Burke W, Freeman MMR. The Whaling Issue (Vol 24, Pg 179, 2000). Mar. Pol. 2000; 24: 501–502; DOI:10.1016/S0308-597X(00)00030-0.
- 19 WDC, Whale and Dolphin Conservation. http://uk.whales.org/ (consultado el 18 de noviembre 2016).
- 20 CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. https://www.cites.org/ (consultado el 2 de diciembre 2016).
- 21 Clapham PJ, Childerhouse S, Gales NJ, Rojas-Bracho L, Tillman MF, Brownell RL. The Whaling Issue: Conservation, Confusion, and Casuistry. *Mar. Pol.* 2007; **31**: 314–319; DOI:10.1016/j.marpol.2006.09.004.
- 22 Reid TR. World whaling body riven by dispute. *The Washington Post*. Publicado el 15 de mayo 1993.

- 23 Reeves RR. The Origins and Character of 'Aboriginal Subsistence' Whaling: A Global Review. *Mammal Rev.* 2002; **32**: 71–106; DOI:10.1046/j.1365-2907.2002.00100.x.
- 24 Whitehead H, Christal J, Dufault S. Past and Distant Whaling and the Rapid Decline of Sperm Whales off the Galapagos Islands. *Conserv. Biol.* 1997; **11**: 1387–1396; DOI:10.1046/j.1523-1739.1997.96246.x.
- 25 Baker CS, Clapham PJ. Modelling the Past and Future of Whales and Whaling. *Trends Ecol. Evol.* 2004; **19**: 365–371; DOI:10.1016/j.tree.2004.05.005.
- 26 Laist DW, Knowlton AR, Mead JG, Collet AS, Podesta M. Collisions Between Ships and Whales. *Mar. Mamm. Sci.* 2001; **17**: 35–75; DOI:10.1111/j.1748-7692.2001.tb00980.x.
- 27 Fais A, Lewis TP, Zitterbart DP, Álvarez O, Tejedor A, Soto NA. Abundance and Distribution of Sperm Whales in the Canary Islands: Can Sperm Whales in the Archipelago Sustain the Current Level of Ship-Strike Mortalities? *PLOS ONE*. 2016; 11: e0150660; DOI:10.1371/journal.pone.0150660.
- 28 Gero S, Whitehead H. Critical Decline of the Eastern Caribbean Sperm Whale Population. *PLOS ONE*. 2016; **11**: e0162019; DOI:10.1371/journal.pone.0162019.
- 29 Ohishi K, Bando T, Abe E, Kawai Y, Fujise Y, Maruyama T. Long-Term and Large-Scale Epidemiology of *Brucella* Infection in Baleen Whales and Sperm Whales in the Western North Pacific and Antarctic Oceans. *J. Vet. Med. Sci.* 2016; **78**: 1457–1464; DOI:10.1292/jvms.16-0076.
- 30 Carlier A, Puisieux F, Lehir A. Analyse Des Pommades. 3. Etude De La Composition Du Blanc De Baleine. *Ann. Pharm. Fr.* 1967; **25**: 473–480.
- 31 Wellendorf M. Composition of Spermaceti. *Nature*. 1963; **198**: 1086–1087; DOI:10.1038/1981086b0.
- 32 Horiguchi T, Takase Y, Arai Y, Ageta H. GC-MS Studies on Ester Components of Spermaceti. J. Nat. Med. 1999; 53: 105–108.
- 33 Acofarma distribución S.A. Fichas de Información Técnica: Esperma de Ballena. http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4555fba9a8883d866bff2f755cae0d02e8b750229e05/main/files/Esperma_de_ballena.pdf (consultado el 23 de noviembre 2016).
- 34 Vidani P. Shark Chunks, Spermaceti Wax. http://sharkchunks.tumblr.com/post/19286300558 (consultado el 24 de noviembre 2016).
- 35 Carlier A, Chaignea.m, Giry L, Puisieux F, Lehir A. Analysis of Pomades. 6. Mass Spectrometric Assay of Cetaceum. *Ann. Pharm. Fr.* 1968; **26**: 599–602.
- 36 Holloway P. Chromatographic Analysis of Spermaceti. J. Pharm. Pharmacol. 1968; 20: 775–779.

- 37 JEEN International Corporation. Ficha de especificaciones Cetyl Esters Wax JEECHEM MST. http://www.jeen.com/technical/SPEC148.pdf (consultado el 23 de noviembre 2016).
- 38 Imperial-Oel-Import. Ficha de especificaciones Spermaceti BP, Synthetic. https://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/2531 (consultado el 23 noviembre 2016).
- 39 Spencer WP. Compositions and Methods for Increased Delivery of Coenzyme Q10. WO2012015969 A1. 2 de febrero 2012.
- 40 Barathur RR, Bookout JB. Transdermal delivery of medicaments with combinations of cetylated fatty ester penetrant complexes. US8394759 B2. 12 de marzo 2013.
- 41 Haas PD, Firat OF, Kandemir L, Koc F, Sivasligil R. A Preparation Method for Suspension of Cetyl Myristate and/or Cetyl Palmitate. WO2012089764 A1. 5 de julio 2012.
- 42 Cosmetic Supplies USA Inc. Ficha técnica del palmitato de cetilo. http://www.cosmeticsuppliesusa.com/pdf/SpecCetylPalmitate.pdf (consultado el 24 de noviembre 2016).
- 43 Venus Ethoxyethers Pvt, Ltd,. Ficha de especificaciones de laurato de cetilo. http://www.venus-goa.com/%20laurato (consultado el 21 de mayo 2014).
- 44 Yasho Industries Pvt. Ltd. Ficha de especificaciones del miristato de cetilo. http://suppliers.jimtrade.com/92/91396/waxy_solid_cetyl_myristate.htm#2 (consultado el 24 de noviembre 2016).
- 45 Fine Organics Industries Pvt. Ltd. Ficha de especificaciones del palmitato de cetilo. http://www.fineorganics.com/colombia/nuestros-productos/aditivos-para-cosmeticos-yproductos-farmaceuticos/finester-ester-waxes/cetyl-palmitate (consultado el 24 de noviembre 2016).
- 46 Venus Ethoxyethers Pvt, Ltd. Ficha de especificaciones del estearato de cetilo. http://www.venus-goa.com/estearato (consultado el 21 de mayo 2014).
- 47 Parchem Fine & Speciality Chemicals. Ficha de técnica del miristato de cetilo. http://www.parchem.com/chemical-supplier-distributor/Cetyl-Myristate-012673.aspx (consultado el 24 de noviembre 2016).
- 48 Scott M. Manufacture of Emulsions by Shock Cooling. *J. Pharm. Sci.* 1964; **53**: 208-210; DOI:10.1002/jps.2600530222.
- 49 Dorgan PD. On the Oils in Cosmetic Use of Marine Composition. *Drugs and Cosmetic*. 1974; **12**: 30–37.
- 50 Singh SK. Handbook on Cosmetics (Processes, Formulae with Testing Methods). ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc.: Delhi, 2010.

- 51 Kikuchi K, Tagami H. Noninvasive Biophysical Assessments of the Efficacy of a Moisturizing Cosmetic Cream Base for Patients with Atopic Dermatitis during Different Seasons. *Br. J. Dermatol.* 2008; **158**: 969–978; DOI:10.1111/j.1365-2133.2008.08478.x.
- 52 Khalil S, Elgamal S. In-Vitro Release of Aspirin from Various Wax-Coated Formulations. *J. Pharm. Pharmacol.* 1971; **23**: 72–74.
- 53 Gross H, Becker C. A Study of Suppository Bases. 1. Review of Literature. J. Am. Phar. Assoc. Scientific Edition. 1953; 42: 90–95.
- 54 Sriamornsak P, Asavapichayont P, Nunthanid J, Luangtana-anan M, Limmatvapirat S, Piriyaprasarth S. Wax-Incorporated Emulsion Gel Beads of Calcium Pectinate for Intragastric Floating Drug Delivery. AAPS PharmSciTech. 2008; 9: 571– 576; DOI:10.1208/s12249-008-9082-4.
- 55 Dolin EJ. Leviathan: The History of Whaling in America. W. W. Norton & Company: New York, 2008.
- 56 Virgin I, Morris EJ. Creating Sustainable Bioeconomies: The Bioscience Revolution in Europe and Africa. Routledge ed.: Abingdon, 2016.
- 57 Suzuki T, Ikesu S, Takahashi M. Anthraquinone Dye and Inkjet Recording Liquid. US7025816 B2. 11 de abril 2006.
- 58 Nakamura Y, Nogami Y, Ohki Y. Process for Cleaning and Image Forming Apparatus Therefor. US7177578 B2. 13 de febrero 2007.
- 59 Kuroki T, Maehashi T. Image Forming Method Utilizing Thermal Transfer Intermediate Transfer Medium. US6951832 B2. 4 de octubre 2005.
- 60 Nakamura Y, Nogami Y. Image Forming Process and Image Forming Apparatus, Electrophotographic Image-Receiving Sheet, and Electrophotographic Print. US7057631 B2. 6 de junio 2006.
- 61 Busson-Breysse J, Farines M, Soulier J. Jojoba Wax: Its Esters and Some of Its Minor Components. J. Am. Oil Chem. Soc. 1994; **71**: 999; DOI:10.1007/BF02542268.
- 62 Sanchez N, Martinez M, Aracil J, Corma A. Synthesis of Oleyl Oleate as a Jojoba Oil Analog. J. Am. Oil Chem. Soc. 1992; **69**: 1150–1153; DOI:10.1007/BF02541053.
- 63 Kalscheuer R, Stöveken T, Luftmann H, Malkus U, Reichelt R, Steinbüchel A. Neutral Lipid Biosynthesis in Engineered *Escherichia Coli*: Jojoba Oil-Like Wax Esters and Fatty Acid Butyl Esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; **72**: 1373–1379; DOI:10.1128/AEM.72.2.1373-1379.2006.
- 64 Ayerza R. Effect of Irrigation on Jojoba Production under Arid Chaco Conditions: II— Seed Yields and Wax Quality. J. Am. Oil Chem. Soc. 1993; **70**: 1225– 1228; DOI:10.1007/BF02564230.

- 65 Martínez M, Torrano E, Aracil J. Synthesis of Esters of High Molecular-Weight an Analog of Jojoba Oil a Statistical Approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1988; **27**: 2179–2182; DOI:10.1021/ie00083a038.
- 66 Chaudhri S, Jain N. History of Cosmetics. *Asian J. Pharm.* 2009; **3**: 164–167; DOI:http://dx.doi.org/10.4103/0973-8398.56292.
- 67 Oumeish OY. The Cultural and Philosophical Concepts of Cosmetics in Beauty and Art through the Medical History of Mankind. *Clin. Dermatol.* 2001; **19**: 375–386; DOI:10.1016/S0738-081X(01)00194-8.
- 68 Barel AO, Paye M, Maibach HI. *Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition*. Taylor & Francis: New York, 2009.
- 69 STANPA :: Asociacion Nacional de Perfumería y Cosmética. http://www.stanpa.com/ (consultado el 2 de diciembre 2016).
- 70 Apaolaza-Ibáñez V, Hartmann P, Diehl S, Terlutter R. Women Satisfaction with Cosmetic Brands: The Role of Dissatisfaction and Hedonic Brand Benefits. *African Journal* of Business Management. 2011; 5: 792–802; DOI:http://dx.doi.org/10.5897/AJBM10.305.
- 71 Cosmetic Europe, Risk and Policy Analysts Ltd. Socio-economic development & environmental sustainability. The European cometics industry's contribution 2017. https://www.cosmeticseurope.eu/files/8614/9738/2777/CE_Socio-economic_development_and_environmental_sustainability_report_2017.pdf (consultado el 5 de septiembre 2017).
- 72 Ensink J. WELL Factsheet: Health impact of handwashing with soap. http://www.lboro.ac.uk/well/resources/fact-sheets/fact-sheets-htm/Handwashing.htm (consultado el 7 de diciembre 2016).
- 73 Green AC, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced Melanoma After Regular Sunscreen Use: Randomized Trial Follow-Up. *JCO*. 2011; **29**: 257–263; DOI:10.1200/JCO.2010.28.7078.
- 74 Boletín Oficial del Estado Documento DOUE-L-2009-82517. https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82517 (consultado el 1 de diciembre 2016).
- 75 Boletín Oficial del Estado Documento BOE-A-2013-8083. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-8083 (consultado el 15 de diciembre 2016).
- 76 Boletín Oficial del Estado Documento DOUE-L-2013-82552. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2013-82552 (consultado el 15 de diciembre 2016).

- 77 Boletín Oficial del Estado Documento DOUE-L-2013-81438. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2013-81438 (consultado el 1 de diciembre 2016).
- 78 Boletín Oficial del Estado Documento BOE-A-1997-23067. http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1997-23067 (consultado el 15 de diciembre 2016).
- 79 Boletín Oficial del Estado Documento BOE-A-2015-8343. http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2015-8343 (consultado el 14 de diciembre 2016).
- 80 Newerli-Guz J. Labelling of organic and natural cosmetic products in harmonized standards. *Zeszyt Naukowy*. 2012; **74**: 36–42.
- 81 Ecocert S.A.S. Standards for natural and organic cosmetics. http://www.makingcosmetics.com/articles/Ecocert-cosmetics-standards.pdf (consultado el 17 de diciembre 2016).
- 82 Ecocert S.A.S. Norma Ecocert: cosméticos naturales y ecológicos. http://www.ecocert.es/sites/default/files/u3/Norma-Ecocert.pdf (consultado el 22 de diciembre 2016).
- 83 COSMOS-standard AISBL. COSMOS-standard Technical Guide. https://cosmosstandard.files.wordpress.com/2016/12/cosmos-standard-technical-guide-v2-10-2511162.pdf (consultado el 22 de diciembre 2016).
- 84 Escutia M, Roldán M, Zarcos A, Errejón N, Redondo L, Lavado B, Gavaldà N, Ortiz D, García S. *Guía de cosmética econatural para profesionales (2^a edición)*. Asociación Vida Sana: Barcelona, 2014.
- 85 ISO Technical committees ISO/TC 217 Cosmetics. http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee%3Fcommid%3D54974 (consultado el 21 de diciembre 2016).
- 86 Harry RG, Rieger MM. *Harry's Cosmeticology 8th Edition*. Chemical Publishing Company: New York, 2000.
- 87 Griffin WC. Classification of Surface-Active Agents by "HBL". J. Cosmet. Sci. 1949; 1: 311–326.
- 88 Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Khan ZI, Khar RK, Aqil M, Talegaonkar S. Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2008; **2**: 275–289.
- 89 Gorcea M, Laura D. Evaluating the Physiochemical Properties of Emollient Esters for Cosmetic Use. *Cosmetics and toiletries*. 2010; **125**: 26–33.

- 90 Parente ME, Gambaro A, Solana G. Study of Sensory Properties of Emollients Used in Cosmetics and Their Correlation with Physicochemical Properties. J. Cosmet. Sci. 2005; 56: 175–182.
- 91 Savary G, Grisel M, Picard C. Impact of Emollients on the Spreading Properties of Cosmetic Products: A Combined Sensory and Instrumental Characterization. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*. 2013; **102**: 371–378; DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.07.028.
- 92 Gilbert L, Savary G, Grisel M, Picard C. Predicting Sensory Texture Properties of Cosmetic Emulsions by Physical Measurements. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 2013; 124: 21–31; DOI:10.1016/j.chemolab.2013.03.002.
- 93 Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A Combined Approach in Characterization of an Effective w/o Hand Cream: The Influence of Emollient on Textural, Sensorial and in Vivo Skin Performance. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2012; **34**: 140–149; DOI:10.1111/j.1468-2494.2011.00693.x.
- 94 Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Dokic L, Savic S. Effect of Small Change in Oil Phase Composition on Rheological and Textural Properties of w/o Emulsion. *J. Texture Stud.* 2013; 44: 34–44; DOI:10.1111/j.1745-4603.2012.00363.x.
- 95 Gallarate M, Mittone E, Carlotti ME, Trotta M, Piccerelle P. Formulation of Dry Emulsion for Topical Applications. *J. Dispersion Sci. Technol.* 2009; **30**: 823–833; DOI:10.1080/01932690802643998.
- 96 Wardhono EY, Zafimahova-Ratisbonne A, Lanoiselle J-L, Saleh K, Clausse D. Optimization of the Formulation of Water in Oil Emulsions Entrapping Polysaccharide by Increasing the Amount of Water and the Stability. *Can. J. Chem. Eng.* 2014; **92**: 1189–1196; DOI:10.1002/cjce.21985.
- 97 Emollients : National Eczema Society. http://www.eczema.org/emollients (consultado el 3 de enero 2017).
- 98 Hughes KJ, Lvovich VF, Woo J, Moran B, Suares A, Truong MHT. Novel Methods for Emollient Characterization. *Cosmetics and toiletries Manufacture Worldwide*. 2010; 19–24.
- 99 Department of Economic and Social Affairs of the United Nations. *The World Population Prospects: 2015 Revision*, Report. 2015.
- 100 United Nations. Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future, Report. 1987.
- 101 Anastas PT, Warner JC. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press: New York, 1998.
- 102 Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. *Biocatalysts and Enzyme Technology, First edition*. Wiley Vch Verlag Gmbh: Weinheim, 2005.

- 103 Zika E, Papatryfon O, Wolf H, Gómez-Barbero H, Stein AJ, Bock AK. *Consequences, Opportunities and Challenges of Modern Biotechnology for Europe*, JCR Reference Reports, EUR 22728 EN. European Commission: Sevilla, 2007.
- 104 Bommarius AS, Riebel BR. *Biocatalysis, Fundamentals and Applications, First edition.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004.
- 105 Lozano P, de Diego T, Carrié D, Vaultier M, Iborra JL. Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150 °C. *Biotechnol Progress*. 2003; **19**: 380–382; DOI:10.1021/bp0257590.
- 106 Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 °C. Science. 1984;
 224: 1249–1251.
- 107 Knez Ž, Laudani CG, Habulin M, Reverchon E. Exploiting the Pressure Effect on Lipase-Catalyzed Wax Ester Synthesis in Dense Carbon Dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* 2007; **97**: 1366–1375; DOI:10.1002/bit.21331.
- 108 Yuan J, Dai Y, Yu Y, Wang P, Wang Q, Fan X. Biocatalytic Synthesis of Poly(ε-Caprolactone) Using Modified Lipase in Ionic Liquid Media. *Eng. Life Sci.* 2016; **16**: 371–378; DOI:10.1002/elsc.201500081.
- 109 Weber N, Weitkamp P, Mukherjee KD. Steryl and Stanyl Esters of Fatty Acids by Solvent-Free Esterification and Transesterification in Vacuo Using Lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 5210–5216; DOI:10.1021/jf0107407.
- 110 Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, 6th ed. Springer: Heidelberg, 2011.
- 111 Poppe JK, Matte CR, Ruaro Peralba M do C, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Zachia Ayub MA. Optimization of Ethyl Ester Production from Olive and Palm Oils Using Mixtures of Immobilized Lipases. *Appl. Catal. A-Gen.* 2015; **490**: 50–56; DOI:10.1016/j.apcata.2014.10.050.
- 112 Shaw S-Y, Chen Y-J, Ou J-J, Ho L. Enzymatic Resolution of Methyl Dl-β-Acetylthioisobutyrate and Dl-β-Acetylthioisobutyramide Using a Stereoselective Esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2006; **38**: 163–170; DOI:10.1016/j.molcatb.2006.01.002.
- 113 Jegannathan KR, Nielsen PH. Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production - a Literature Review. J. Clean Prod. 2013; 42: 228–240; DOI:10.1016/j.jclepro.2012.11.005.
- 114 Hüsing B, Jaeckel G, Wörner S, Würth A. *The Introduction of Process-Integrated Biocatalysts in Companies Effect of Dynamics in Internal and External Networks*, JCR Reference Reports, EUR 19582 EN. European Commission: Sevilla, 2000.

- 115 Chen J, Wang Q, Hua Z, Du G. Research and Application of Biotechnology in Textile Industries in China. *Enzyme Microb. Technol.* 2007; **40**: 1651–1655; DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.07.040.
- 116 Csiszar E. Enzymes in Preparatory and Finishing Processes of Cotton and Linen Fabrics. *Cell Chem. Technol.* 2008; **42**: 577–581.
- 117 Andreu P, Collar C, Martínez-Anaya MA. Thermal Properties of Doughs Formulated with Enzymes and Starters. *Eur Food Res Technol.* 1999; **209**: 286– 293; DOI:10.1007/s002170050495.
- 118 Ortega-Requena S, Bódalo-Santoyo A, Bastida-Rodríguez J, Máximo-Martín MF, Montiel-Morte MC, Gómez-Gómez M. Optimized Enzymatic Synthesis of the Food Additive Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR) Using Novozym[®] 435 in a Solvent Free System. *Biochem. Eng. J.* 2014; 84: 91–97; DOI:10.1016/j.bej.2014.01.003.
- 119 Skals PB, Krabek A, Nielsen PH, Wenzel H. Environmental Assessment of Enzyme Assisted Processing in Pulp and Paper Industry. *Int J Life Cycle Assess.* 2008; 13: 124; DOI:10.1065/lca2007.11.366.
- 120 Hata K, Matsukura M, Taneda H, Fujita Y. Mill-Scale Application of Enzymatic Pitch Control during Paper Production. *Enzymes for pulp and paper processing*, 1996.
- 121 Homann MJ, Vail R, Morgan B, Sabesan V, Levy C, Dodds DR, Zaks A. Enzymatic Hydrolysis of a Prochiral 3-Substituted Glutarate Ester, an Intermediate in the Synthesis of an NK1/NK2 Dual Antagonist. *Adv. Synth. Catal.* 2001; **343**: 744–749; DOI:10.1002/1615-4169(200108)343:6/7<744::AID-ADSC744>3.0.CO;2-E.
- 122 De Vries AHM, De Vries JG, Van Assema FBJ, De Lange B, Mink D, Hyet DJ, Maas PJD. Process for the Preparation of Enantiomerically Enriched Indoline-2-Carboxylic Acid. US7732621 B2. 8 de Junio 2010.
- 123 Krause P, Hilterhaus L, Fieg G, Liese A, Bornscheuer U. Chemically and Enzymatically Catalyzed Synthesis of C6–C10 Alkyl Benzoates. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009; **111**: 194–201; DOI:10.1002/ejlt.200800135.
- 124 Sun S, Shan L, Jin Q, Liu Y, Wang X. Solvent-Free Synthesis of Glyceryl Ferulate Using a Commercial Microbial Lipase. *Biotechnol. Lett.* 2007; 29: 945–949; DOI:10.1007/s10529-007-9338-1.
- 125 Zhao X, El-Zahab B, Brosnahan R, Perry J, Wang P. An Organic Soluble Lipase for Water-Free Synthesis of Biodiesel. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007; **143**: 236–243; DOI:10.1007/s12010-007-8043-9.
- 126 Mangas-Sánchez J, Serrano-Arnaldos M, Adlercreutz P. Effective and Highly Selective Lipase-Mediated Synthesis of 2-Monoolein and 1,2-Diolein in a Two-Phase System. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2015; 112: 9–14; DOI:10.1016/j.molcatb.2014.11.014.

- 127 Arroyo M. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. Ars *Pharmaceutica*. 1998; **39:2**: 23–29.
- 128 Cao L. *Carrrier-Bound Immobilized Enzymes, First Edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2005; DOI:10.1002/3527607668.
- 129 Kapoor M, Gupta MN. Lipase Promiscuity and Its Biochemical Applications. *Process Biochem.* 2012; **47**: 555–569; DOI:10.1016/j.procbio.2012.01.011.
- 130 Kwon S, Song K, Hong W, Rhee J. Removal of Water Produced from Lipase-Catalyzed Esterification in Organic-Solvent by Pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.* 1995; 46: 393– 395; DOI:10.1002/bit.260460413.
- 131 Lei Q, Ba S, Zhang H, Wei Y, Lee JY, Li T. Enrichment of Omega-3 Fatty Acids in Cod Liver Oil via Alternate Solvent Winterization and Enzymatic Interesterification. *Food Chem.* 2016; **199**: 364–371; DOI:10.1016/j.foodchem.2015.12.005.
- 132 Otero C, Márquez P, Criado M, Hernández-Martín E. Enzymatic Interesterification Between Pine Seed Oil and a Hydrogenated Fat to Prepare Semi-Solid Fats Rich in Pinolenic Acid and Other Polyunsaturated Fatty Acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 2012; 90: 81–90; DOI:10.1007/s11746-012-2149-0.
- 133 Kaki SS, Grey C, Adlercreutz P. Bioorganic Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Esters of Natural Phenolics and α-Lipoic Acid. J. Biotechnol. 2012; 157: 344– 349; DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.11.012.
- 134 Ferrario V, Ebert C, Knapic L, Fattor D, Basso A, Spizzo P, Gardossi L. Conformational Changes of Lipases in Aqueous Media: A Comparative Computational Study and Experimental Implications. *Adv. Synth. Catal.* 2011; **353**: 2466–2480; DOI:10.1002/adsc.201100397.
- 135 Pleiss J, Fischer M, Schmid RD. Anatomy of Lipase Binding Sites: The Scissile Fatty Acid Binding Site. *Chem. Phys. Lipids.* 1998; **93**: 67–80; DOI:10.1016/S0009-3084(98)00030-9.
- 136 Ottosson J. Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis: A Study of Lipase Enantioselectivity. Tesis Doctoral. Royal Institute of Technology: Stockholm, 2001.
- 137 Verger R. 'Interfacial Activation' of Lipases: Facts and Artifacts. *Trends Biotechnol*. 1997; **15**: 32–38; DOI:10.1016/S0167-7799(96)10064-0.
- 138 Adlercreutz P. Immobilisation and Application of Lipases in Organic Media. *Chem. Soc. Rev.* 2013; **42**: 6406–6436; DOI:10.1039/c3cs35446f.
- 139 Klibanov AM. Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents. *Trends Biochem. Sci.* 1989; **14**: 141–144; DOI:10.1016/0968-0004(89)90146-1.
- 140 Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006; **39**: 235–251; DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

- 141 Domínguez de María P, Carboni-Oerlemans C, Tuin B, Bargeman G, van der Meer A, van Gemert R. Biotechnological Applications of *Candida antarctica* Lipase A: State-of-the-Art. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2005; 37: 36–46; DOI:10.1016/j.molcatb.2005.09.001.
- 142 Kirk O, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Org. Process Res. Dev.* 2002; **6**: 446–451; DOI:10.1021/op0200165.
- 143 Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B from *Candida antarctica. Structure.* 1994; **2**: 293–308; DOI:10.1016/S0969-2126(00)00031-9.
- 144 Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal Biotransformation*. 1998;
 16: 181–204; DOI:10.3109/10242429809003198.
- 145 Uppenberg J, Oehrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthonsen T, Jones TA. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry*. 1995; 34: 16838–16851; DOI:10.1021/bi00051a035.
- 146 Naik S, Basu A, Saikia R, Madan B, Paul P, Chaterjee R, Brask J, Svendsen A. Lipases for Use in Industrial Biocatalysis: Specificity of Selected Structural Groups of Lipases. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2010; 65: 18–23; DOI:10.1016/j.molcatb.2010.01.002.
- 147 Derewenda Z, Derewenda U, Dodson G. The Crystal and Molecular-Structure of the *Rhizomucor miehei* Triacylglyceride Lipase at 1.9-Angstrom Resolution. J. Mol. Biol. 1992; 227: 818–839; DOI:10.1016/0022-2836(92)90225-9.
- 148 Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a Biocatalyst in Fats and Oils Modification. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2010; **66**: 15–32; DOI:10.1016/j.molcatb.2010.03.008.
- 149 Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2010; 62: 197–212; DOI:10.1016/j.molcatb.2009.11.010.
- 150 Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold Active Microbial Lipases: Some Hot Issues and Recent Developments. *Biotechnol. Adv.* 2008; 26: 457–470; DOI:10.1016/j.biotechadv.2008.05.003.
- 151 Ito S, Kobayashi T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Hatada Y. Alkaline Detergent Enzymes from Alkaliphiles: Enzymatic Properties, Genetics, and Structures. *Extremophiles*. 1998; 2: 185–190; DOI:10.1007/s007920050059.
- 152 Jaeger K-E, Reetz MT. Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998; **16**: 396–403; DOI:10.1016/S0167-7799(98)01195-0.

- 153 Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnol. Adv.* 2001; **19**: 627–662; DOI:10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
- 154 Usluoglu A, Arabaci G. Bleaching of Cotton/Polyamide Fabrics with Enzymes and Peracetic Acid. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 2014; **9**: 364–367; DOI:10.1002/apj.1804.
- 155 Chen S, Lin Y, Zhang Y, Wang XH, Yang JL. Enzymatic Pitch Control at Nanping Paper Mill. *Tappi J*. 2001; **84**.
- 156 Fukuda S, Hayashi S, Ochiai H, Iiizumi T, Nakamura K. Improvers for Deinking of Wastepaper. Patente japonesa 2,229,290. 1990.
- 157 Babaki M, Yousefi M, Habibi Z, Mohammadi M, Yousefi P, Mohammadi J, Brask J. Enzymatic Production of Biodiesel Using Lipases Immobilized on Silica Nanoparticles as Highly Reusable Biocatalysts: Effect of Water, t-Butanol and Blue Silica Gel Contents. *Renewable Energy*. 2016; **91**: 196–206; DOI:10.1016/j.renene.2016.01.053.
- 158 Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. *Bioresour. Technol.* 2005; 96: 769–777; DOI:10.1016/j.biortech.2004.05.029.
- 159 Borrelli GM, Trono D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; **16**: 20774–20840; DOI:10.3390/ijms160920774.
- 160 Pellis A, Ferrario V, Zartl B, Brandauer M, Gamerith C, Acero EH, Ebert C, Gardossi L, Guebitz GM. Enlarging the Tools for Efficient Enzymatic Polycondensation: Structural and Catalytic Features of Cutinase 1 from *Thermobifida cellulosilytica*. *Catal. Sci. Technol.* 2015; DOI:10.1039/C5CY01746G.
- 161 Kadokawa J, Kobayashi S. Polymer Synthesis by Enzymatic Catalysis. *Curr Opin Chem Biol.* 2010; **14**: 145–153; DOI:10.1016/j.cbpa.2009.11.020.
- 162 Ragupathy L, Ziener U, Dyllick-Brenzinger R, von Vacano B, Landfester K. Enzyme-Catalyzed Polymerizations at Higher Temperatures: Synthetic Methods to Produce Polyamides and New Poly(Amide-Co-Ester)S. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2012; 76: 94–105; DOI:10.1016/j.molcatb.2011.11.019.
- 163 Mei Y, Kumar A, Gross R. Kinetics and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Solution Polymerization of ε-Caprolactone. *Macromolecules*. 2003; **36**: 5530– 5536; DOI:10.1021/ma025741u.
- Mahapatro A, Kumar A, Kalra B, Gross RA. Solvent-Free Adipic Acid/1,8-Octanediol Condensation Polymerizations Catalyzed by *Candida antartica* Lipase B. *Macromolecules*. 2004; **37**: 35–40; DOI:10.1021/ma025796w.

- 165 Bódalo A, Bastida J, Máximo MF, Montiel MC, Murcia MD, Ortega S. Influence of the Operating Conditions on Lipase-Catalysed Synthesis of Ricinoleic Acid Estolides in Solvent-Free Systems. *Biochem. Eng. J.* 2009; 44: 214–219; DOI:10.1016/j.bej.2008.12.007.
- 166 Aguieiras ECG, Veloso CO, Bevilaqua JV, Rosas DO, da Silva MAP, Langone MAP. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme Research*. 2011; **2011**: 1– 7; DOI:10.4061/2011/432746.
- 167 Cammarota MC, Freire DMG. A Review on Hydrolytic Enzymes in the Treatment of Wastewater with High Oil and Grease Content. *Bioresour. Technol.* 2006; **97**: 2195– 2210; DOI:10.1016/j.biortech.2006.02.030.
- 168 Holm HC, Cowan D. The Evolution of Enzymatic Interesterification in the Oils and Fats Industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; **110**: 679–691; DOI:10.1002/ejlt.200800100.
- 169 Ortega S, Máximo MF, Montiel MC, Murcia MD, Arnold G, Bastida J. Esterification of Polyglycerol with Polycondensed Ricinoleic Acid Catalysed by Immobilised *Rhizopus* oryzae Lipase. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2013; **36**: 1291–1302; DOI:10.1007/s00449-012-0874-2.
- 170 Gumel AM, Annuar MSM, Heidelberg T, Chisti Y. Lipase Mediated Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. *Process Biochem.* 2011; 46: 2079–2090; DOI:10.1016/j.procbio.2011.07.021.
- 171 Martins AB, da Silva AM, Schein MF, Garcia-Galan C, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Comparison of the Performance of Commercial Immobilized Lipases in the Synthesis of Different Flavor Esters. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2014; **105**: 18–25; DOI:10.1016/j.molcatb.2014.03.021.
- 172 Li Z, Tang X, Huang W, Liu JG, Tilley M, Yao Y. Rheology, Microstructure, and Baking Characteristics of Frozen Dough Containing *Rhizopus chinensis* Lipase and Transglutaminase. *Cereal Chem.* 2011; **88**: 596–601; DOI:10.1094/CCHEM-07-11-0082.
- 173 Bezborodov AM, Zagustina NA. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Synthesis of Pharmaceuticals (Review). *Appl Biochem Microbiol*. 2016; **52**: 237–249; DOI:10.1134/S0003683816030030.
- 174 Hanson RL, Shi Z, Brzozowski DB, Banerjee A, Kissick TP, Singh J, Pullockaran AJ, North JT, Fan J, Howell J, Durand SC, Montana MA, Kronenthal DR, Mueller RH, Patel RN. Regioselective Enzymatic Aminoacylation of Lobucavir to Give an Intermediate for Lobucavir Prodrug. *Bioorg. Med. Chem.* 2000; 8: 2681–2687; DOI:10.1016/S0968-0896(00)00209-1.
- 175 Gonawan FN, Yon LS, Kamaruddin AH, Uzir MH. Effect of Co-Solvent Addition on the Reaction Kinetics of the Lipase-Catalyzed Resolution of Ibuprofen Ester. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2013; 88: 672–679; DOI:10.1002/jctb.3885.
- 176 Ansorge-Schumacher MB, Thum O. Immobilised Lipases in the Cosmetics Industry. *Chem. Soc. Rev.* 2013; **42**: 6475–6490; DOI:10.1039/c3cs35484a.
- 177 Thum O, Oxenbøll KM. Biocatalysis: A Sustainable Process for Production of Cosmetic Ingredients. SOFW Journal: International Journal for Applied Science (English edition). 2008; 134: 44–47.
- 178 Thum O. Enzymatic Production of Care Specialties Based on Fatty Acid Esters. *Tenside Surfactants Deterg.* 2004; **41**: 287–290.
- 179 Hills G. Industrial Use of Lipases to Produce Fatty Acid Esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003; **105**: 601–607; DOI:10.1002/ejlt.200300853.
- 180 Veit T. Biocatalysis for the Production of Cosmetic Ingredients. *Eng. Life Sci.* 2004; **4**: 508–511; DOI:10.1002/elsc.200402148.
- 181 Novozymes A/S. Lipozyme[®] CALB L. A Lipase Preparation Produced by *Aspergillus niger* Expressing a Gene Encoding a Lipase from *Candida antarctica*, 2004. https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInvent ory/ucm268192.pdf (consultado el 12 de febrero 2017).
- 182 Hartree E. Determination of Protein Modification of Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. Anal. Biochem. 1972; 48: 422–427; DOI:10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- 183 Ortega Requena S. Síntesis biocatalítica de polirricinoleato de poliglicerol. Tesis doctoral. Universidad de Murcia: Murcia, 2011.
- 184 The PubChem Project. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (consultado el 24 de agosto 2016).
- 185 ASTM D974–02e1, Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2002; DOI:10.1520/D0974-02E01.
- 186 ASTM D1957-86(2001), Standard Test Method for Hydroxyl Value of Fatty Oils and Acids (Withdrawn 2007). ASTM International: West Conshohocken, PA, 1986; DOI:10.1520/D1957-86R01.
- 187 ASTM D5558-95(2011), Standard Test Method for Determination of the Saponification Value of Fats and Oils. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2011; DOI:10.1520/D5558-95R11.
- 188 ASTM D5554-95, Standard Test Method for Determination of the Iodine Value of Fats and Oils. ASTM International: Conshohocken, PA, 1995; DOI:10.1520/D5554-95.
- 189 Sakaki K, Aoyama A, Nakane T, Ikegami T, Negishi H, Watanabe K, Yanagishita H. Enzymatic Synthesis of Sugar Esters in Organic Solvent Coupled with Pervaporation. *Desalination*. 2006; **193**: 260–266; DOI:10.1016/j.desal.2005.06.063.

- 190 Lee DE, Park KM, Choi SJ, Shim J-H, Chang P-S. Enhancing Operational Stability and Exhibition of Enzyme Activity by Removing Water in the Immobilized Lipase-Catalyzed Production of Erythorbyl Laurate. *Biotechnol Progress*. 2013; **29**: 882–889; DOI:10.1002/btpr.1745.
- 191 Adnani A, Basri M, Chaibakhsh N, Salleh AB, Rahman MBA. Lipase-Catalyzed Synthesis of a Sugar Alcohol-Based Nonionic Surfactant. *Asian J. Chem.* 2011; **23**: 388–392.
- 192 Paludo N, Alves JS, Altmann C, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. The Combined Use of Ultrasound and Molecular Sieves Improves the Synthesis of Ethyl Butyrate Catalyzed by Immobilized *Thermomyces lanuginosus* Lipase. *Ultrason. Sonochem.* 2015; 22: 89–94; DOI:10.1016/j.ultsonch.2014.05.004.
- 193 Petersson AEV, Gustafsson LM, Nordblad M, Börjesson P, Mattiasson B, Adlercreutz P. Wax Esters Produced by Solvent-Free Energy-Efficient Enzymatic Synthesis and Their Applicability as Wood Coatings. *Green Chem.* 2005; 7: 837–843; DOI:10.1039/B510815B.
- 194 Ye R, Hayes DG. Optimization of the Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis of Fructose-Oleic Acid Ester Through Programming of Water Removal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011; **88**: 1351–1359; DOI:10.1007/s11746-011-1791-2.
- 195 Montiel MC, Serrano M, Máximo MF, Gómez M, Ortega-Requena S, Bastida J. Synthesis of Cetyl Ricinoleate Catalyzed by Immobilized Lipozyme[®] CALB Lipase in a Solvent-Free System. *Catal. Today.* 2015; 255: 49–53; DOI:10.1016/j.cattod.2014.09.015.
- 196 Serrano-Arnaldos M, Máximo-Martín MF, Montiel-Morte MC, Ortega-Requena S, Gómez-Gómez E, Bastida-Rodríguez J. Solvent-Free Enzymatic Production of High Quality Cetyl Esters. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2016; **39**: 641–649; DOI:10.1007/s00449-016-1545-5.
- 197 Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson CH. Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalysed by Immobilized Lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 1992; **14**: 426–446; DOI:10.1016/0141-0229(92)90135-B.
- 198 Basri M, Kassim MA, Mohamad R, Ariff AB. Optimization and Kinetic Study on the Synthesis of Palm Oil Ester Using Lipozyme[®] TL IM. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2013; 85– 86: 214–219; DOI:10.1016/j.molcatb.2012.09.013.
- 199 Choi N, Kim Y, Lee J-S, Kwak J, Lee J, Kim I-H. Synthesis of Fatty Acid Ethyl Ester from Acid Oil in a Continuous Reactor via an Enzymatic Transesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2016; **93**: 311–318; DOI:10.1007/s11746-016-2786-9.

- 200 Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM. A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports. *Biotechnol. Bioeng.* 1998; **58**: 486–493; DOI:10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9.
- 201 López Alfocea CI. Preparación de Un Derivado Inmovilizado de Lipozyme[®] CALB L Para La Síntesis de Polirricinoleato de Poliglicerol. Trabajo Fin de Carrera, Ingeniero Químico. Universidad de Murcia: Murcia, 2011.
- 202 Martínez Toro P. Optimización Del Proceso de Inmovilización de La Lipasa de *Candida antarctica* Para La Síntesis de Polirricinoleato de Poliglicerol. Trabajo Fin de Carrera, Ingeniero Químico. Murcia, 2013.
- 203 Severac E, Galy O, Turon F, Pantel CA, Condoret J-S, Monsan P, Marty A. Selection of CalB Immobilization Method to Be Used in Continuous Oil Transesterification: Analysis of the Economical Impact. *Enzyme Microb. Technol.* 2011; **48**: 61–70; DOI:10.1016/j.enzmictec.2010.09.008.
- 204 Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P. Adsorption of Lipase on Polypropylene Powder. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1997; **1345**: 188–196; DOI:10.1016/S0005-2760(96)00176-2.
- 205 Blanco RM, Terreros P, Munoz N, Serra E. Ethanol Improves Lipase Immobilization on a Hydrophobic Support. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2007; **47**: 13–20; DOI:10.1016/j.molcatb.2007.03.003.
- 206 Chen B, Miller ME, Gross RA. Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity. *Langmuir*. 2007; **23**: 6467–6474; DOI:10.1021/la063515y.
- 207 Nakaoki T, Kalra B, Kumar A, Gross RA, Kirk O, Christensen M. Candida antarctica Lipase B Catalyzed Polymerization of Lactones: Effect of Immobilization Matrix on Polymerization Kinetics and Molecular Weight. Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. 2002; 224: U473–U473.
- 208 Chen B, Miller EM, Miller L, Maikner JJ, Gross RA. Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. *Langmuir*. 2007; 23: 1381–1387; DOI:10.1021/la062258u.
- 209 Mihailović M, Stojanović M, Banjanac K, Carević M, Prlainović N, Milosavić N, Bezbradica D. Immobilization of Lipase on Epoxy-Activated Purolite[®] A109 and Its Post-Immobilization Stabilization. *Process Biochem.* 2014; **49**: 637–646; DOI:10.1016/j.procbio.2014.01.013.

- 210 Hilterhaus L, Minow B, Mueller J, Berheide M, Quitmann H, Katzer M, Thum O, Antranikian G, Zeng AP, Liese A. Practical Application of Different Enzymes Immobilized on Sepabeads. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2008; **31**: 163–171; DOI:10.1007/s00449-008-0199-3.
- 211 Alcaraz Díaz S. Empleo de Un Nuevo Derivado Inmovilizado de Lipasa de Candida antarctica (Lipozyme[®] CalB L) Como Biocatalizador En La Síntesis de Ésteres Emolientes. Trabajo Fin de Carrera, Ingeniero Químico. Universidad de Murcia: Murcia, 2013.
- 212 Poojari Y, Clarson SJ. Thermal Stability of *Candida antarctica* Lipase B Immobilized on Macroporous Acrylic Resin Particles in Organic Media. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2013; **2**: 7–11; DOI:10.1016/j.bcab.2012.10.002.
- 213 Guidelines for the Characterization of Immobilized Biocatalysts: Worked out by The Working Party on Immobilized Biocatalysts within The European Federation of Biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 1983; **5**: 304–307; DOI:10.1016/0141-0229(83)90082-0.
- 214 Ortega S, Montiel MC, Serrano M, Maximo MF, Bastida J. "100% natural" myristyl myristate. Study of the biocatalytic synthesis process. *Afinidad*. 2015; **72**: 155–159.
- 215 Peng LF, Xu XB, Mu HL, Hoy CE, Adler-Nissen J. Production of Structured Phospholipids by Lipase-Catalyzed Acidolysis: Optimization Using Response Surface Methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 2002; **31**: 523–532; DOI:10.1016/S0141-0229(02)00147-3.
- 216 Trubiano G, Borio D, Errazu A. Influence of the Operating Conditions and the External Mass Transfer Limitations on the Synthesis of Fatty Acid Esters Using a *Candida antarctica* Lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 2007; **40**: 716–722; DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.06.003.
- 217 Axial Flow Turbine Axial Propellers Mixer Direct http://www.mixerdirect.com/impellers/medium-shear/axial-flow-turbine.html (consultado el 25 de junio 2017).
- 218 Doran PM. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia: Zaragoza, 1998.
- 219 Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, Gardossi L. Efficient Immobilisation of Industrial Biocatalysts: Criteria and Constraints for the Selection of Organic Polymeric Carriers and Immobilisation Methods. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 6262–6276; DOI:10.1039/c3cs35464d.
- 220 García T, Coteron A, Martínez M, Aracil J. Kinetic Modelling of Esterification Reactions Catalysed by Immobilized Lipases. *Chem. Eng. Sci.* 1996; **51**: 2841–2846; DOI:10.1016/0009-2509(96)00162-5.

- 221 Clausse D, Gomez F, Pezron I, Komunjer L, Dalmazzone C. Morphology Characterization of Emulsions by Differential Scanning Calorimetry. *Adv. in Colloid and Interface Sci.* 2005; **117**: 59–74; DOI:10.1016/j.cis.2005.06.003.
- 222 Iyengar B, Schlenk H. Melting Points of Synthetic Wax Esters. *Lipids*. 1969; **4**: 28-; DOI:10.1007/BF02531790.
- 223 Knothe G, Dunn RO. A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009; **86**: 843–856; DOI:10.1007/s11746-009-1423-2.
- 224 Vijayakumar B, Nagendrappa G, Prakash BSJ. Synthesis of Ester Components of Spermaceti and a Jojoba Oil Analogue Catalyzed by Acid Activated Indian Bentonite under Microwave Irradiation. *Indian J. Chem. Technol.* 2009; **16**: 377–381.
- 225 Clausse D, Gomez F, Dalmazzone C, Noik C. A Method for the Characterization of Emulsions, Thermogranulometry: Application to Water-in-Crude Oil Emulsion. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; **287**: 694–703; DOI:10.1016/j.jcis.2005.02.042.
- 226 Gilbert L, Picard C, Savary G, Grisel M. Rheological and Textural Characterization of Cosmetic Emulsions Containing Natural and Synthetic Polymers: Relationships between Both Data. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 2013; **421**: 150–163; DOI:10.1016/j.colsurfa.2013.01.003.
- 227 Tufvesson P, Tornvall U, Carvalho J, Karlsson AJ, Hatti-Kaul R. Towards a Cost-Effective Immobilized Lipase for the Synthesis of Specialty Chemicals. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2011; **68**: 200–205; DOI:10.1016/j.molcatb.2010.11.004.
- 228 Comisión Nacional de los Mercados y la Competencia. Boletín de Indicadores Eléctricos, 2016.

https://www.cnmc.es/ca/listado/sucesos_energia_mercado_electrico_boletines_de_indica dores_electricos/block/250 (consultado el 30 de agosto 2017).



7. Anexos

Anexo I

Fichas técnicas de los biocatalizadores comerciales y de los soportes empleados para la inmovilización.



CalB immo Plus

Certificate of Analysis

CalB immo Plus was jointly developed and is co-marketed by c-LEcta and 🌔 Purolite

Reference	Lot-No.	specific activity
UNIV MURCIA SR-110691	WN 1/24	9550PLU/g

Immobilized, recombinant Lipase B from Candida antarctica (CalB) produced by microbial fermentation with Pichia pastoris. The immobilized lipase is supplied as dry spherical beads. The product should be stored at 4°C. CalB immo Plus is suitable for applications in organic solvents and solvent-free systems. The lipase is immobilized by adsorption on the highly hydrophobic carrier ECR1030M (based on a styrene/methacrylate polymer) from Purolite and can be used for (regioand stereoselective) esterifications / transesterifications / amidations.

		1	
Criteria	Method	Specification	Result
Appearance	Visual Purolite SOP – PITM1	White to slightly yellow spherical beads	Compliant
Activity	60°C; Synthesis of propyllaureate ¹	> 9,000 PLU/g	9550+/- 500 PLU/g
Moisture	Weight loss after drying at 105°C Purolite SOP – PITM4	< 5.0%	2.9%
Particle size distribution	 > 95% of particles within the specified size distribution, measured by using QicPic instrument (Purolite Internal method) 	300 – 710 μm	Compliant
Mean diameter	measured by using QicPic instrument (Purolite Internal method)	400-550 µm	426 µm, compliant

¹ Unit definition PLU: One unit corresponds to the synthesis of 1 µmol per minute propyllaureate from lauric acid and 1-propanol at 60°C

11th November 2014

Quality Control

c-LEcta - enzymes and strains

c-LEcta GmbH Perlickstr. 5 04103 Leipzig, Germany Tel: +49 (0) 341 3552140 Fax: +49 (0) 341 35521433

Date

E-mail: contact@c-LEcta.com Web: http://www.c-lecta.com Geschäftsführer / CEO: Marc Struhalla USt-IdNr. / VAT ID No.: DE234875039 Handelsreg. / commercial reg.: Leipzig, HRB 20561 BIC: WELADE8LXXX

Bank: Sparkasse Leipzig BLZ / sort code: 86055592 Account: 1100550727 IBAN: DE02 8605 5592 1100 5507 27



In this product the key enzyme activity is provided by

lipase that hydrolyzes esterbonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES	
Component name	Lipase
Activity	10000 PLU/g
Color	Off-white
Physical form	Immobilized Granulate
Approximate density (g/ml)	0.40
Color can vary from batch to batch. Color intensity is not a of enzyme activity.	n indication
PRODUCT SPECIFICATION	

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Propyl laurate unit PLU	10000		/g
Loss on drying 105 C	-	3	%
The enzyme analytical method is avail representative.	able from the Custo	omer Center or sale	s

GM STATUS

- This product is not a GMO
- Production organism
- Aspergillus niger The enzyme product is manufactured by fermentation of a microorganism that is not present in the final product. The production organism is improved by means of modern biotechnology

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-25 °C (32-77 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to

- avoid the need for a higher dosage Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or
- on the product label.
- The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best-before date.
- Novozymes guarantees delivery at least 6 months prior to the best-before date

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 initiate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills

COMPLIANCE

Kosher certificate is available from the Customer Center or sales representative.

Novozymes A/S Krogshoejvej 36 2880 Bagsvaerd Denmark

Tel. +45 4446 0000 Fax +45 4446 9999

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.





PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information

1 of 1

Valid from 2012-02-14

Product Data Sheet



Lipozyme® RM

In this product the key enzyme activity is provided by

lipase that hydrolyzes esterbonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Declared enzyme	Lipase
Declared activity	275 IUN/g
Color	Brown
Physical form	Immobilized Granulate
Color can vary from batch to batch. Colo of enzyme activity.	or intensity is not an indication

PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Interestification unit IUN	275		/g
Loss on drying	-	5	%
Total viable count	-	50000	/g
Coliform bacteria	-	30	/g
E.coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g
Heavy metals		Max 30	mg/kg
Lead		Max 5	mg/kg
Arsenic		Max 3	mg/kg
Cadmium		Max 0.5	mg/kg
Mercury		Max 0.5	mg/kg

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

COMPOSITION

PRC

Ingredients	Appr. % (w/w)
Phenolic resin, CAS no	79
Water, CAS no. 7732-18-5	10
Lipase, CAS no. 9001-62-1*	6
Fish gelatine , CAS no	5

DUCTION ORGANISM	
Production organism	Aspergillus oryzae
Donor organism	Rhizomucor miehei
Produced by submerged fermentatio	n of a genetically modified micro organism

The enzyme protein, which in itself is not genetically modified, is separated and purified from the production organism.

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-10 °C (32-50 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best-before date.

The product can be delivered at ambient temperature. Following delivery, the product should be stored as recommended at 0-10 $^\circ$ C/32-50 $^\circ$ F.

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. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

COMPLIANCE

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).

Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

Novozymes A/S Krogshoejvej 36 2880 Bagsvaerd Denmark

Tel. +45 4446 0000 Fax +45 4446 9999 For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S

Product Data Sheet



1 of 2 Valid from 2016-04-11

Lipozyme® TL

In this product the key enzyme activity is provided by

lipase that hydrolyzes esterbonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Component name	Lipase
Activity	250 IUN/0
Color	Off-white
Physical form	Immobilized Granulate
Approximate density (g/ml)	0.40
Carriers	Maltodextrin
	Silicon Dioxide, carrie

Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.

PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Interestification unit IUN	250		/g
Bulk density	0.36	0.49	g/ml
Loss on drying 105 C	-	8	%
Laser diffraction >1180 micron	-	15	%
Laser diffraction <250 micron	-	10	%
Total viable count	-	50000	/g
Coliform bacteria	-	30	/g
E.coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g
Heavy metals		Max 30	mg/kg
Lead		Max 5	mg/kg
Arsenic		Max 3	mg/kg
Cadmium		Max 0.5	mg/kg
Mercury		Max 0.5	mg/kg

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

COMPOSITION

Carriers	Maltodextrin
	Silicon Dioxide, carrier
Preservatives	Sodium benzoate
	Potassium sorbate
Stabilizers	Sodium chloride

ALLERGEN

Allergen	Substance contained ¹	Allergen	Substance contained
Celery	no	Molluscs	no
Cereals containing gluten ²	no	Mustard	no
Crustaceans	no	Nuts ³	no
Egg	no	Peanuts	no
Fish	no	Sesame	no
Lupin	no	Soy	no
Milk (including lactose)	no	Sulphur dioxide/sulphites, more than 10 mg per kg or l	no

¹Definition of substances according to EU Regulation 1169/2011, as amended. List covers allergens mentioned in 21 USC 301 (US) and GB

7718-2011 (China).

²i.e.wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut

^ai.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, Brazil nut, pistacchio nut, macadamia nut and Queensland nut

GM STATUS

This product is not a GMO.

The enzyme product is manufactured by fermentation of a microorganism that is not present in the final product. The production organism is improved by means of modern biotechnology.

STORAGE CONDITION

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance if stored at 0–10 °C/32–50 °F and used prior to the best-before date. If stored at max. 25 °C/77 °F, the product should be used within 3 months after delivery.

The product can be transported at ambient temperature. Following delivery, the product should be stored as recommended.

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. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

novozymes

2 of 2

Lipozyme® TL

COMPLIANCE

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).

Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



FOOD SAFETY

Novozymes has carried out a hazard analysis and prepared an HACCP plan describing the critical control points (CCPs). The HACCP plan is supported by a comprehensive prerequisite program implemented in Novozymes' GMP practices. The product is produced according to Novozymes'

HACCP plan, GMP practices, and additional requirements controlled by Novozymes' Quality Management System.

The product complies with FAO/WHO JECFA- and FCC-recommended purity requirements regarding mycotoxins.

The product is produced under FSSC 22000 certification.

PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

Novozymes A/S Krogshoejvej 36 2880 Bagsvaerd Denmark

Tel. +45 4446 0000 Fax +45 4446 9999 For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S



Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH is a macroporous adsorber resin without functional groups. It has a very good chemical and mechanical stability and beads of uniform size (monodisperse). It can be used in the:

Extraction / Purification of:

» natural or synthetic organic products in the chemical or pharmaceutical industry

Adsorption / Removal of:

- » anionic, cationic and nonionic surfactants
- » chlorinated and nitrated hydrocarbons
- » colorants or inert organic materials
- » residual concentrations of liquid-liquid extractants, e.g. tributylphosphate and di-2ethyhexlphosphate in the recycling of effluents, treatment of solutions of organic chemical products and purification of industrial effluents
- » removal of non-polar organic ingredients of low molecular mass from landfill leachates

Lewatit® VP OC 1064 MD PH has the following properties:

- » very good mechanical stability and low attrition
- » longer resin life time and better regeneration efficiency compared to activated carbon
- » high adsorption capacity especially at medium and high feed concentration
- » good kinetic performance during adsorption and elution

Prior to industrial application, preliminary tests should be carried out on a laboratory scale, in order to determine the maximum adsorptive capacity and the optium regenerant. Experience has shown that the end -capacity of the adsorber resin is reached after the third cycle.

The special properties of this product can only be fully utilized if the technology and process used correspond to the current state-of-the -art. Further advice in this matter can be obtained from Lanxess, Business Unit Ion Exchange Resins.

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13 Previous Edition: 2011-05-12

1/4



PRODUCT INFORMATION LEWATIT® VP OC 1064 MD PH



General Description

Ionic form as shipped	neutral
Functional group	none
Matrix	crosslinked polystyrene
Structure	porous beads
Appearance	white, opaque

Physical and Chemical Properties

		metric units			
Uniformity Coefficient*		max.		1.1	
Mean bead size*		mm	0.44	-	0.54
Bulk weight	(+/- 5%)	g/l		600	
Density		approx. g/ml		1.02	
Water retention		wt. %	50	-	60
Surface area	BET	approx. m²/g		800	
Pore volume		approx. cm³/g		1.2	
Pore diameter	average	nm	5	-	10
Stability	at pH-range		0	-	14
Stability	temperature range	ç	-20	-	120
Storability	of the product	max. years			
Storability	temperature range	°C	-20	-	40

2/4

* Specification values subjected to continuous monitoring.

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13 Previous Edition: 2011-05-12



PRODUCT INFORMATION LEWATIT® VP OC 1064 MD PH

Recommended Operating Conditions*

		metric units				
Operating temperature		max. °C		120		
Operating pH-range			1	-	14	
Bed depth		min. mm		1000		
Specific pressure drop	(15 ℃)	approx. kPa*h/m²		1.5		
Pressure drop		max. kPa		250		
Linear velocity	operation	max. m/h		20		
Linear velocity	backwash (20 °C)	approx. m/h	1	-	5	
Bed expansion	(20 °C, per m/h)	approx. vol. %	80	-	100	**
Freeboard	backwash (extern / intern)	vol. %		100		
Regenerant				***		
Linear velocity	regeneration	approx. m/h		5		
Linear velocity	rinsing	approx. m/h		5		
Rinse water requirement	slow / fast	approx. BV		5		

* The recommended operating conditions refer to the use of the product under normal operating conditions. It is based on tests in pilot plants and data obtained from industrial applications. However, additional data are needed to calculate the resin volumes required for ion exchange units. These data are to be found in our Technical Information Sheets.

** In Methanol: approx. 6 % m/h

*** As regenerantes organic solvents like isopropanole or methanol can be used. Some adsorbates can be desorbed by NaOH / HCl too.

3/4

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13 Previous Edition: 2011-05-12 LANXESS Energizing Chemistry

Lewatit[®]

Lewatit

PRODUCT INFORMATION LEWATIT® VP OC 1064 MD PH

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community Ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

This information and our technical advice – whether verbal, in writing or by way of trials – are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. Our advice does not release you from the obligation to check its validity and to test our products as to their suitability for the intended processes and uses. The application, use and processing of our products and the products manufactured by you on the basis of our technical advice are beyond our control and, therefore, entirely your own responsibility. Our products are old in accordance with the current version of our General Conditions of Sale and Delivery.

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13 Previous Edition: 2011-05-12

4/4

LENNTECH

info@lenntech.com www.lenntech.com Tel. +31-15-261.09.00 Fax. +31-15-261.62.89



ROHM: HAAS 🔼

AMBERLI TE™ XAD ™1 180N Macroreticular Polymeric Adsorbent

Description

AMBERLITE XAD1180N is a polymeric adsorbent supplied as insoluble white beads. It is a non ionic, hydrophobic, cross-linked polymer which derives its adsorptive properties from its patented macroreticular structure (containing both a continuous polymer phase and a continuous pore phase), high surface area, and the aromatic nature of its surface (Figure 1). This structure also gives AMBERLITE XAD1180N polymeric adsorbent excellent physical, chemical, and thermal stability.

AMBERLITE XAD1180N polymeric adsorbent can be regenerated and used through repeated cycles, in either column or batch modes, to adsorb hydrophobic molecules from polar solvents. Its characteristic pore size distribution makes AMBERLITE XAD1180N polymeric adsorbent an excellent choice for the selective separation of a wide variety of large organic molecules from aqueous solutions or polar solvents such as plant extracts, antibiotics, and fermentation products.

Typical Properties These properties are typical but do not const	tute specifications.
Matrix	Macroreticular cross-linked aromatic polymer
Physical form	White translucent beads
Moisture holding capacity ^[1]	61 to 67%
Shipping weight	690 g/L
Specific gravity	1.015 to 1.025
Particle size	
Harmonic mean size	0.350 - 0.600 mm
Uniformity coefficient	≤1.8
Fines content ^[1]	≺0.250 mm : 5.0% max
Coarse beads	>0.850 mm : 10.0% max.
Maximum reversible swelling	see Table 1
Surface area ^[2]	≥450 m ² /g
Porosity ^[2]	≥1.4 cc/g

^[1]Contractual value

^[2]Values based on statistical quality control (SQC) Test methods are available on request.

Suggested Operating Conditions

ouggested operating conditions	
pH range	1 to 14
Maximum temperature limit	150°C
Minimum bed depth	750 mm (Capture) – 1500 mm (Chromatography)
Flow rate	
Loading	2 – 16 BV/h
Displacement	1 - 4 BV/h
Regeneration	1 – 4 BV/h
Rinse	1 — 8 BV/h



 Table 1: Percent swelling of Amberlite XAD1180 polymeric adsorbent in various solvents (Water: Solvent)

Solvent	% Increase from as-received volume
Methanol	10
2-propanol	15
Acetone	10
p-Xylene (via methanol)	10

Pretreatment

AMBERLITE XAD1180N polymeric adsorbent is shipped as a water wet product im bibed with sodium chloride (NaCl) and sodium carbonate (Na $_2$ O $_3$) salts to inhibit bacterial growth. These salts must be washed from the adsorbent prior to use and it is suggested that this be achieved by washing with water at a linear flowrate of 5-10 m/h until the required level is achieved. In some sensitive applications, residual monomeric or oligomeric compounds may be required to be removed from the adsorbent. A regeneration with the proposed regenerant is also recommended prior to beginning the first service cycle. If the regenerant is an alcohol, it must be displaced with water prior to beginning the first loading cycle.

Sample Preparation for Testing

Samples of AMBERLITE XAD1180N polymeric adsorbent must be pre-treated prior to laboratory testing to ensure proper results. Please refer to Rohm and Haas publication IE-245 "Laboratory Column Procedures and Testing of AMBERLITE and Duolite Polymeric Adsorbents," section "Preparation of Resins."

Applications

 Recovery and purification of antibiotics, water soluble steroids, enzymes and proteins AMBERLITE XAD1180N can be considered as a general purpose resin for these types of applications where relatively large solutes (>1000D) are to be adsorbed. In these types of applications, the loading and elution flowrates are relatively low (0.5-2 BV/h). The pH of the solution has a significant effect on the loading and elution and as the feed is often derived from a fermentation, the regeneration tends to be aggressive - 4% NaOH at elevated temperatures and solvents. A primary concern in this type of application is the separation of two or more similar solutes. In these cases, the engineering is a key point to consider during both pilot scale and final plant design.

Recovery of plant extracts

The relatively large pores of AMBERLITE XAD1180N allow complex molecules to be adsorbed within its structure. Loading is performed at relatively low flowrates (0.5 - 2 BV/h). Elution tends to be performed with solvents at low temperatures or steam depending on the stability of the molecule of interest.

Enzyme immobilization

The relatively large pores of AMBERLITE XAD1180N make this resin an ideal candidate for the immobilization of enzymes.

Separation of non polar organic solutes from polar solvents

AMBERLITE XAD1180N would be a useful candidate for study if the solutes have a large molecular weight which resulted in a low operating capacity for either AMBERLITE XAD16 or AMBERLITE XAD4. An example of this type of application would be the removal of high molecular weight color from a process stream.

Scavenger or pre-column

Due to the large pore and better kinetics, AMBERLITE XAD1180N has been studied as a scavenger or precolumn in front of the main adsorption column, particularly when using AMBERLITE XAD1600.

Regenerants/ Eluting Agents

- Water miscible organic solvents (methanol, ethanol, acetone, isopropanol, etc.) for hydrophobic compounds.
- Pure solvents for regenerating resin fouled by oils and antifoams. Dilute bases (0.1 0.5% NaOH) for eluting weakly acidic compounds. .
- Strong bases (2-4% NaOH) for regenerating resins fouled with proteins, peptides.
- Dilute acids (0.1 0.5% HCl) for weakly basic compounds.
- Dilute oxidizing agents (< 0.5%) such as peroxide to enhance the removal of protein fouling.
- Buffer elution for pH sensitive compounds. Water where adsorption is from an ionic solution.
- Hot nitrogen or steam for volatile materials

Hydraulic Characteristics

Figure 4 shows the bed expansion of AMBERLITE XAD1180N as a function of backwash flow rate and water temperature. Figure 5 shows the pressure drop for AMBERLITE XAD1180N, as a function of service flow rate and water temperature. Pressure drop data are valid at the start of the service run with a clear water and a correctly classified bed.



Material Safety Data Sheets

Material Safety Data Sheets (MSDS) are available for all AMBERLITE polymeric adsorbents. These sheets contain pertinent information that you may need to protect your employees and customers against any known health or safety hazards associated with our products.

We recommend that you obtain copies of our MSDS from your local Rohm and Haas technical representative before using our products in your facilities. We also suggest that you contact your suppliers of other materials recommended for use with our products for appropriate health and safety precautions before using them.

AMBERLITE and XAD are trademarks of Rohm and Haas Company, Philadelphia, U.S.A.

Ion exchangeresins and polymeric adsorbents, as produced, contain by-products resulting from the manufacturing process. The user must determine the extent to which organic by-products must be removed for any particular use and establish techniques to assure that the appropriate level of purity is achieved for that use. The user must ensure compliance with all prudent safety standards and regulatory requirements governing the application. Except where specifically otherwise stated, Rohm and Haas Company does not recommend its ion exchange resins or polymeric adsorbents, as supplied, as being suitable or appropriately pure for any particular use. Consult your Rohm and Haas technical representative for further information.

Acidic and basic regenerant solutions are corrosive and should be handled in a manner that will prevent eye and skin contact. Nitric acid and other strong oxidizing agents can cause explosive type reactions when mixed with I on Exchange resins. Proper design of process equipment to prevent rapid buildup of pressure is necessary if use of an oxidizing agent such as nitric acid is contemplated. Before using strong oxidising agents in contact with ion exchange Resins, consult sources knowledgeable in the handling of these materials.

Rohm and Haas Company makes no warranties, either expressed or implied, as to the accuracy or appropriateness of this data and expressly excludes any liability upon Rohm and Haas arising out of its use. We recommend that the prospective users determine for themselves the suitability of Rohm and Haas materials and suggestions for any use prior to their adoption. Suggestions for uses of our products or the inclusion of descriptive material from patents and the citation of specific patents in this publication should not be understood as recommending the use of our products in violation of any patent or as permission or license to use any patents of the Rohm and Haas Company. Material Safety Data Sheets outlining the hazards and handling methods for our products are available on request.

ROHM HAAS 🔼

© Rohm and Haas, 2007 All rights reserved.

IE-624EDS - March 05 - 4/4



Purolite Ltd Unit D, Llantrisant Business Park Llantrisant, CF72 8LF Wales, UK T: +44 (0)1443 229 334 F: +44 (0)1443 222 336 www.purolite.com

Company Registration No: 1840987

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Reference: University Murcia SR-110691 Order No. : 46993 Date: November 11th, 2014

PRODUCT NAME		Lifetech™ E	CR1090M
PRODUCT CODE		011	.05
DESCRIPTION		Macroporo	us styrene
BATCH NUMBER		JFP 1	2/30
QUANTITY		500	Dg
FUNCTIONAL GROUPS		No	ne
pH LIMITS STABILITY		1 -	14
APPEARANCE		White Sphe	rical Beads
SUPPLIED AS		Wet	
Total Moisture as Shipped	%	69.6	
Perfect Beads	%	100	
Cracked Beads	%	0	ŀ
Pieces	%	0	ł
Mis-shapes	%	0	ŀ
		Specification	Results
Surface Area	sq.m/ g dry	>750	782
Mean pore diameter	Å	900 - 1100 940	
Particle size range	microns	300 - 710	Conform
Mean diameter	microns		518

Authorised By:

🛟 Purolite

Purolite Ltd Unit D, Llantrisant Business Park Llantrisant, CF72 8LF Wales, UK T: +44 (0)1443 229 334 F: +44 (0)1443 222 336 www.purolite.com

Company Registration No: 1840987

Reference:	University Murcia
	SR-110691

Order No. : 46993 Date: November 11th , 2014

PRODUCT NAME		Lifetech™ I	CR8806M
PRODUCT CODE		014	15
DESCRIPTION		Octadecyl m	ethacrylate
BATCH NUMBER		CBR	3/79
QUANTITY		50	Dg
FUNCTIONAL GROUPS		Octad	lecyl
pH LIMITS STABILITY		2 -	10
APPEARANCE		White Sphe	rical Beads
SUPPLIED AS		Wet	
Total Moisture as Shipped	%	59.6	
Perfect Beads	%	100	
Cracked Beads	%	C	
Pieces	%	C	ł
Mis-shapes	%	C	ŀ
		Specification	Results
Mean pore diameter	Å	500 - 700	513
Surface Area	m²/g	>80	98
Particle size range	microns	300 - 710	Conform
Mean diameter	microns		428

Authorised By: QC Manager



Purolite Ltd Unit D, Llantrisant Business Park Llantrisant, CF72 8LF Wales, UK T: +44 (0)1443 229 334 F: +44 (0)1443 222 336 www.purolite.com

Company Registration No: 1840987

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Reference: University Murcia SR-110691 Order No. 46993 Date: November 11th, 2014

PRODUCT NAME		Lifetech™ E	CR8285M
PRODUCT CODE		012	65
DESCRIPTION		Epoxy/butyl r	nethacrylate
BATCH NUMBER		RL 1	l/6
QUANTITY		500	Dg
FUNCTIONAL GROUPS		Epo	ху
pH LIMITS STABILITY		5 -	9
APPEARANCE		White Spherical Beads	
SUPPLIED AS		Wet	
Total Moisture as Shipped	%	75.6	
Perfect Beads	%	9	7
Cracked Beads	%	0	ŀ
Pieces	%	1	
Mis-shapes	%	2	
		Specification	Results
Mean pore diameter	Å	400 - 700	468
Particle size range	microns	100 - 710	Conform
Mean diameter	microns		375

Authorised By: QC Manager Flan

Anexo II

Resultados de la experimentación en un reactor abierto a la atmósfera empleando biocatalizadores comerciales.

Comprobación de la actividad de los biocatalizadores comerciales.

Tabla II.1- Número ácido de las muestras tomadas en los ensayos realizados en un reactor abierto para la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 1 g de biocatalizador.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (inin)	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
0	120.57	120.55	121.83	120.77
5	74.15	69.53	73.91	107.70
10	43.13	49.22	47.19	92.04
15	29.48	29.09	29.42	74.43
20		19.64	18.92	
30	12.33	15.62	9.93	44.66
40		10.34	6.20	
45	6.44			22.84
60	4.31	5.33	4.51	11.48
90	4.12	5.29	3.81	5.87
120	2.71	3.59	3.28	4.12

Tabla II.2- Conversión alcanzada durante los ensayos realizados en un reactor abierto para la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 1 g de biocatalizador.

Tioner o (min)		Con	versión (%)	
Tiempo (mm)	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	38.50	42.32	39.34	10.82
10	64.22	59.17	61.26	23.79
15	75.55	75.87	75.85	38.37
20		83.71	84.47	
30	89.77	87.04	91.85	63.02
40		91.42	94.91	
45	94.66			81.08
60	96.43	95.58	96.30	90.49
90	96.59	95.61	96.87	95.14
120	97.75	97.02	97.31	96.59

Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción.

Tabla II.3- Número ácido de las muestras tomadas en los ensayos realizados en un reactor abierto con ácido mirístico y alcohol cetílico a 70 °C, 350 rpm e incubando previamente 0.5 g de biocatalizador durante 60 min.

Tiempo	N.A. (mg KOH/g)				
(min)	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM	
0	134.59	139.20	130.40	130.70	
60	135.38	136.91	131.21	131.33	
180	133.94	139.49	130.60	133.59	
360	134.66	141.88	129.87	130.78	

Influencia de la presencia de humedad en el medio de reacción.

Tabla II.4- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 0.1 g de Novozym[®] 435 en un reactor abierto y de altas prestaciones.

Tionero (min)	N.A. (mg KOH/g)		
Tiempo (mm)	Presión atmosférica	Vacío	
0	123.08	119.56	
5	118.46		
10	113.35		
15		105.73	
20	103.60		
30	92.66	88.61	
45	76.79	75.24	
60	64.31	64.92	
75	51.67		
90	41.09	44.09	
120	24.31	28.95	
150	15.99	19.21	
180	10.97	13.03	
210	7.99		
240	6.07	6.39	
1440	3.44	1.22	

T :	Conversión (%)		
Tiempo (min) —	Presión atmosférica	Vacío	
0	0.00	0.00	
5	3.75		
10	7.91		
15		11.57	
20	15.83		
30	24.72	25.89	
45	37.61	37.07	
60	47.75	45.70	
75	58.02		
90	66.62	63.12	
120	80.25	75.79	
150	87.01	83.93	
180	91.09	89.10	
210	93.51		
240	95.07	94.66	
1440	97.21	98.98	

Tabla II.5- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 0.1 g de Novozym[®] 435 en un reactor abierto y de altas prestaciones.

Tabla II.6- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo a 65 °C y 350 rpm con 0.1 g de Novozym[®] 435 en un reactor abierto y de altas prestaciones.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)		
Tiempo (mm)	Presión atmosférica	Vacío	
0	118.00	117.30	
5	113.32		
10	100.29		
15	96.83	101.17	
20	93.72		
30	83.20	83.70	
45	69.21	73.37	
60	57.05	63.12	
75	44.30	51.27	
90	35.40	42.33	
120	20.66	27.26	
150	12.16	17.69	
180	7.67	9.42	
240	4.24	2.72	
1400	2.46	1.99	

T:	Conversión (%)		
Tiempo (min)	Presión atmosférica	Vacío	
0	0.00	0.00	
5	3.97		
10	15.01		
15	17.94	13.75	
20	20.58		
30	29.49	28.64	
45	41.35	37.45	
60	51.65	46.19	
75	62.46	56.29	
90	70.00	63.91	
120	82.49	76.76	
150	89.69	84.92	
180	93.50	91.97	
240	96.41	97.68	
1400	97.92	98.30	

Tabla II.7- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo a 65 °C y 350 rpm con 0.1 g de Novozym[®] 435 *en un reactor abierto y de altas prestaciones.*

Tabla II.8- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo a 70 °C y 350 rpm con 0.5 g de Novozym[®] 435 un reactor abierto y de altas prestaciones.

Tiomno (min) —	N.A. (mg KOH/g)		
	Presión atmosférica	Vacío	
0	106.57	106.00	
5	84.97		
10	62.59		
15	42.83	25.09	
20	30.19		
30	13.91	13.74	
45	5.32	5.32	
60	3.46	3.55	
75	3.30		
90	2.78	3.17	
120	2.60	2.27	
150	2.41		
180	2.53	2.25	
240		2.27	
360		1.36	
1440	2.75		

T :	N.A. (mg K	OH/g)	
Tiempo (min) —	Presión atmosférica	Vacío	
0	0.00	0.00	
5	20.26		
10	41.27		
15	59.81	76.33	
20	71.67		
30	86.95	87.04	
45	95.00	94.98	
60	96.76	96.65	
75	96.91		
90	97.39	97.01	
120	97.56	97.86	
150	97.74		
180	97.63	97.87	
240		97.86	
360		98.72	
1440	97.42		

Tabla II.9- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo a 70 °C y 350 rpm con 0.5 g de Novozym[®] 435 en un reactor abierto y de altas prestaciones.

Anexo III

Resultados de la experimentación en un reactor de altas prestaciones empleando biocatalizadores comerciales.

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: CalB immo Plus.

Tabla III.1- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	133.43	136.14	133.78	133.37
15	103.63	73.26	37.35	17.67
30	78.21	42.43	12.21	5.90
45	57.04	22.04	5.61	2.21
60	42.20	10.29	3.11	1.73
90	20.64	3.76	1.26	1.31
120	10.98	2.55	1.25	1.25
180	4.03	1.33	1.34	1.32
240	2.10	1.33	1.28	1.34
360	1.24	1.27	1.28	1.33

Tabla III.2- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tioner o (min)	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	22.34	46.19	72.08	86.75
30	41.38	68.84	90.87	95.58
45	57.25	83.81	95.81	98.34
60	68.38	92.44	97.68	98.70
90	84.53	97.24	99.06	99.01
120	91.77	98.12	99.06	99.06
180	96.98	99.02	99.00	99.01
240	98.43	99.02	99.04	99.00
360	99.07	99.07	99.05	99.00

Tabla III.3- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	131.65	125.50	125.20	126.29
15	100.06	66.75	37.77	18.29
30	75.54	42.16	12.57	6.82
45	51.16	20.95	5.40	2.86
60	37.93	11.50	2.82	1.67
90	16.77	4.18	1.63	1.62
120	8.19	2.49	1.64	1.67
180	3.43	1.65	1.63	1.62
240	2.08	1.68	1.66	1.67
360	1.66	1.66	1.64	1.61

Tabla III.4- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T!	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	23.99	46.82	69.83	85.52
30	42.62	66.41	89.96	94.60
45	61.14	83.31	95.69	97.74
60	71.19	90.84	97.75	98.68
90	87.26	96.67	98.70	98.71
120	93.78	98.02	98.69	98.68
180	97.40	98.69	98.70	98.72
240	98.42	98.66	98.67	98.68
360	98.74	98.68	98.69	98.73

Tabla III.5- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	117.18	117.71	114.52	116.44
15	86.02	69.10	38.74	21.84
30	64.54	43.19	15.74	8.57
45	50.82	21.57	5.36	3.39
60	36.45	12.61	3.09	1.93
90	17.27	4.81	2.27	1.91
120	10.51	3.02	2.29	1.88
180	3.95	1.73	1.88	1.92
240	2.61	1.73	2.27	1.87
360	1.75	1.74	2.20	1.87

Tabla III.6- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tionno (min)	Conversión (%)			
Tiempo (min) -	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	26.59	41.30	66.17	81.24
30	44.92	63.31	86.25	92.64
45	56.63	81.68	95.32	97.09
60	68.90	89.29	97.30	98.34
90	85.26	95.92	98.02	98.36
120	91.03	97.43	98.00	98.38
180	96.63	98.53	98.36	98.35
240	97.78	98.53	98.02	98.39
360	98.51	98.52	98.08	98.40

Tabla III.7- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min) -	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	106.06	107.90	110.69	111.59
15	86.07	63.26	37.25	18.80
30	67.19	37.25	14.62	8.37
45	50.09	21.75	9.59	4.42
60	36.91	12.95	5.23	2.61
90	19.88	5.69	3.50	2.20
120	10.33	2.60	3.10	2.20
180	4.58	1.71	2.67	1.76
240	2.94	1.75	2.20	1.73
360	2.10	1.74	1.78	1.76

Tabla III.8- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de CalB immo Plus: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T :	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	18.84	41.37	66.35	83.15
30	36.64	65.48	86.79	92.50
45	52.77	79.84	91.34	96.04
60	65.20	87.99	95.28	97.66
90	81.26	94.73	96.84	98.03
120	90.26	97.59	97.20	98.03
180	95.68	98.41	97.59	98.42
240	97.22	98.38	98.01	98.45
360	98.02	98.39	98.39	98.42

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: Novozym® 435.

Tabla III.9- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiampa (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	132.25	133.62	129.13	132.50
15	103.21	71.62	33.18	16.55
30	81.16	37.09	10.72	5.33
45	53.56	18.10	5.63	3.31
60	41.83	9.78	3.31	2.59
90	22.79	4.18	2.40	2.23
120	12.63	3.09	2.39	1.88
180	4.80	2.34	1.87	1.86
240	2.40	1.91	1.40	1.90
360	2.37	1.85	1.75	1.86

Tabla III.10- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min) -	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	21.96	46.40	74.31	87.51
30	38.63	72.25	91.70	95.98
45	59.50	86.46	95.64	97.50
60	68.37	92.68	97.44	98.04
90	82.76	96.87	98.15	98.32
120	90.45	97.69	98.15	98.58
180	96.37	98.25	98.55	98.59
240	98.19	98.57	98.92	98.57
360	98.21	98.61	98.65	98.59

Tabla III.11- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	123.70	122.06	124.96	125.88
15	93.78	73.56	34.32	15.66
30	76.36	42.58	11.66	5.72
45	56.58	23.41	5.51	3.74
60	40.34	13.38	4.00	2.85
90	18.95	5.24	2.58	2.29
120	9.33	3.27	2.39	2.24
180	3.69	2.31	2.33	1.77
240	3.20	1.91	1.81	1.76
360	2.38	1.77	1.81	1.71

Tabla III.12- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T :	Conversión (%)			
Tiempo (min) -	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	24.19	39.73	72.53	87.56
30	38.27	65.11	90.67	95.46
45	54.26	80.82	95.59	97.03
60	67.39	89.04	96.80	97.73
90	84.68	95.71	97.94	98.18
120	92.46	97.32	98.08	98.22
180	97.02	98.10	98.14	98.59
240	97.42	98.43	98.55	98.60
360	98.08	98.55	98.55	98.65

Tabla III.13- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min) -	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	120.55	118.70	121.03	123.36
15	89.42	61.74	30.31	15.50
30	68.50	35.41	9.96	5.44
45	47.72	17.53	3.78	2.93
60	37.80	9.60	3.09	2.32
90	20.43	4.25	2.02	2.27
120	10.33	2.82	1.97	2.36
180	4.40	2.00	1.56	2.37
240	2.81	1.98	1.91	1.90
360	1.96	1.54	1.58	1.58

Tabla III.14- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T :	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	25.82	47.98	74.95	87.44
30	43.17	70.17	91.77	95.59
45	60.41	85.23	96.88	97.62
60	68.64	91.91	97.45	98.12
90	83.06	96.42	98.33	98.16
120	91.43	97.62	98.37	98.08
180	96.35	98.32	98.71	98.08
240	97.67	98.33	98.43	98.46
360	98.37	98.71	98.69	98.72
Tabla III.15- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiampa (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	105.33	106.31	106.00	110.81
15	93.94	66.65	25.09	15.71
30	70.78	36.82	13.74	6.03
45	55.22	19.94	5.32	3.69
60	41.26	10.34	3.55	2.47
90	22.47	4.13	3.17	2.03
120	13.81	2.91	2.27	2.07
180	4.97	2.05	2.25	3.33
240	4.15	4.14	2.27	2.45
360	2.07	2.07	1.36	1.65

Tabla III.16- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Novozym[®] 435: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min) -	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	10.82	37.31	76.33	85.82	
30	32.80	65.37	87.04	94.56	
45	47.58	81.24	94.98	96.67	
60	60.83	90.27	96.65	97.77	
90	78.67	96.12	97.01	98.17	
120	86.89	97.26	97.86	98.14	
180	95.29	98.07	97.87	96.99	
240	96.06	96.11	97.86	97.79	
360	98.03	98.05	98.72	98.51	

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: Lipozyme® RM IM.

Tabla III.17- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg KOH/g)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	132.74	132.83	137.54	136.46	
15	106.56	82.84	54.86	22.41	
30	83.79	51.40	20.37	7.16	
45	62.86	28.78	7.93	4.27	
60	43.80	15.90	4.69	2.51	
90	20.69	5.32	2.90	2.52	
120	8.53	3.87	2.54	2.57	
180	3.35	3.48	2.49	2.13	
240	2.54	2.56	2.14	2.10	
360	2.09	2.07	2.10	1.71	

Tabla III.18- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)			
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	19.72	37.63	60.11	83.58
30	36.88	61.30	85.19	94.75
45	52.65	78.33	94.23	96.87
60	67.00	88.03	96.59	98.16
90	84.41	95.99	97.89	98.16
120	93.57	97.09	98.15	98.12
180	97.48	97.38	98.19	98.44
240	98.09	98.08	98.44	98.46
360	98.43	98.44	98.47	98.75

Tabla III.19- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)	N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	114.10	121.94	125.15	124.00	
15	94.34	75.65	52.47	25.35	
30	77.47	42.73	18.01	8.50	
45	57.04	22.02	7.12	4.19	
60	38.85	11.00	4.23	3.35	
90	21.66	4.60	2.94	2.49	
120	9.78	3.01	2.99	2.56	
180	4.29	2.56	2.51	2.46	
240	2.89	2.54	2.52	2.09	
360	2.19	2.14	2.11	1.71	

Tabla III.20- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T!	Conversión (%)				
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	17.32	37.96	58.07	79.56	
30	32.11	64.96	85.61	93.14	
45	50.01	81.94	94.31	96.62	
60	65.95	90.98	96.62	97.30	
90	81.02	96.23	97.65	97.99	
120	91.42	97.54	97.61	97.94	
180	96.24	97.90	98.00	98.01	
240	97.46	97.92	97.99	98.32	
360	98.08	98.25	98.31	98.62	

Tabla III.21- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	116.15	116.19	113.38	116.28	
15	94.39	71.60	42.90	21.57	
30	76.56	39.15	14.07	7.4	
45	57.03	24.34	5.99	4.67	
60	44.36	10.46	3.73	3.28	
90	22.52	4.33	2.74	3.19	
120	11.29	3.58	2.32	2.76	
180	4.22	2.53	1.83	2.77	
240	3.21	2.14	1.85	2.31	
360	2.73	2.15	1.87	1.86	

Tabla III.22- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	18.73	38.38	62.16	81.45	
30	34.09	66.31	87.59	93.64	
45	50.90	79.05	94.72	95.98	
60	61.81	91.00	96.71	97.18	
90	80.61	96.27	97.58	97.26	
120	90.28	96.92	97.95	97.63	
180	96.37	97.82	98.39	97.62	
240	97.24	98.16	98.37	98.01	
360	97.65	98.15	98.35	98.40	

Tabla III.23- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	108.46	105.92	106.09	107.66
15	94.37	67.65	48.28	22.29
30	75.82	43.79	19.28	7.82
45	58.84	22.50	8.22	5.16
60	42.78	13.14	5.04	4.54
90	24.48	5.55	3.18	4.19
120	11.68	3.62	2.72	4.68
180	5.15	2.78	2.78	3.65
240	3.73	2.76	2.30	3.18
360	2.72	1.81	2.30	2.81

Tabla III.24- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min) -	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	12.99	36.13	54.49	79.30	
30	30.09	58.65	81.82	92.74	
45	45.74	78.76	92.25	95.21	
60	60.56	87.60	95.25	95.78	
90	77.43	94.76	97.00	96.11	
120	89.23	96.58	97.43	95.65	
180	95.25	97.37	97.38	96.61	
240	96.56	97.40	97.84	97.05	
360	97.49	98.29	97.83	97.39	

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: Lipozyme® TL IM.

Tabla III.25- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tioner (min)		N.	A. (mg KOH/g		
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	131.06	125.82	126.93	125.82	132.91
15	123.46	116.65	105.31	83.31	37.86
30	121.13	105.54	86.99	43.27	12.05
45	115.27	96.92	66.18	20.26	5.91
60	110.82	88.90	49.05	9.01	4.10
90	102.94	72.22	23.03	4.14	3.12
120	96.75	57.78	9.44	2.73	3.08
180	81.27	31.27	3.21	1.84	2.29
240	67.84	13.75	2.36	1.84	2.21
360	41.06	3.25	1.82	1.82	1.82
480	22.96	2.72			
1440	2.72				

Tabla III.26- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tioner (min)		C	Conversión (%)		
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	5.80	7.29	17.04	33.79	71.51
30	7.58	16.12	31.46	65.61	90.94
45	12.05	22.97	47.86	83.90	95.55
60	15.44	29.34	61.36	92.84	96.91
90	21.46	42.60	81.86	96.71	97.65
120	26.18	54.08	92.56	97.83	97.68
180	37.99	75.15	97.47	98.53	98.27
240	48.24	89.07	98.14	98.53	98.34
360	68.67	97.42	98.56	98.56	98.63
480	82.48	97.84			
1440	97.92				

Tioner (min) -		N.	A. (mg KOH/g	()	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	123.77	123.74	122.08	121.66	121.85
15	119.40	112.57	98.15	71.04	33.69
30	116.24	104.74	79.64	35.31	10.80
45	108.36	95.41	61.25	17.01	6.00
60	102.84	86.47	45.48	7.64	3.99
90	93.26	67.36	19.66	3.65	2.69
120	85.83	48.93	9.74	2.63	2.73
180	68.80	25.47	3.56	2.19	2.21
240	56.72	11.69	2.20	1.81	2.23
360	29.61	4.43	1.77	1.76	1.78
480	16.23	3.11			
1440	1.76				

Tabla III.27- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tabla III.28- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tiomero (min)		C	Conversión (%)		
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	3.53	9.03	19.60	41.61	72.35
30	6.08	15.36	34.76	70.97	91.14
45	12.46	22.90	49.83	86.02	95.07
60	16.91	30.12	62.74	93.72	96.73
90	24.65	45.57	83.90	97.00	97.79
120	30.66	60.46	92.02	97.84	97.76
180	44.41	79.42	97.08	98.20	98.18
240	54.18	90.56	98.20	98.52	98.17
360	76.07	96.42	98.55	98.55	98.54
480	86.89	97.48			
1440	98.57				

T :		N.	A. (mg KOH/g	()	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	116.48	113.10	116.51	118.62	118.01
15	111.65	101.55	93.94	70.60	34.99
30	106.68	94.96	76.96	38.72	12.14
45	102.60	87.87	61.08	18.35	6.46
60	98.11	79.93	46.06	9.51	4.64
90	89.69	60.75	24.00	3.96	3.02
120	81.46	46.86	11.94	3.04	2.61
180	66.28	24.12	3.93	3.03	2.17
240	55.25	12.78	3.08	3.00	2.61
360	27.34	4.35	2.15	2.12	1.73
480	14.52	2.40			
1440	2.59				

Tabla III.29- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tabla III.30- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tioner o (min)		C	Conversión (%)		
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	4.15	10.21	19.38	40.49	70.35
30	8.41	16.04	33.94	67.36	89.71
45	11.92	22.31	47.58	84.53	94.52
60	15.77	29.33	60.47	91.98	96.07
90	23.00	46.29	79.40	96.67	97.44
120	30.07	58.57	89.75	97.44	97.79
180	43.10	78.67	96.62	97.45	98.16
240	52.56	88.70	97.35	97.47	97.79
360	76.53	96.15	98.16	98.21	98.54
480	87.54	97.87			
1440	97.78				

				、 、	
Tiompo (min) -		N.	.A. (mg KOH/g	()	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	108.99	106.48	109.23	105.42	109.15
15	104.78	99.44	89.73	68.32	38.92
30	100.83	91.17	70.82	36.23	11.72
45	97.80	82.26	57.23	17.55	5.82
60	94.19	76.03	42.38	8.87	4.18
90	92.44	59.90	22.92	3.95	3.25
120	82.84	46.61	11.59	2.87	2.72
180	65.80	26.63	4.13	2.04	2.32
240	51.43	12.91	2.83	2.05	2.28
360	27.98	4.15	2.03	1.62	1.81
480	13.54	2.76			
1440	2.30				

Tabla III.31- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tabla III.32- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tioner (min)		C	Conversión (%)		
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	3.86	6.62	17.85	35.19	64.34
30	7.49	14.38	35.16	65.63	89.26
45	10.26	22.75	47.60	83.35	94.67
60	13.58	28.60	61.20	91.58	96.17
90	15.19	43.74	79.02	96.26	97.02
120	23.99	56.23	89.39	97.28	97.51
180	39.63	74.99	96.22	98.06	97.87
240	52.82	87.88	97.41	98.06	97.91
360	74.32	96.10	98.14	98.46	98.34
480	87.57	97.41			
1440	97.89				

Influencia de la temperatura de operación.

Tabla III.33- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en un reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de CalB immo Plus, Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] RM IM y 1 g de Lipozyme[®] TL IM.

	N.A. (mg KOH/g)						
Tiempo (min)	CalB immo Plus			Ν	Novozym [®] 435		
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C	
0	121.52	124.45	125.18	131.07	118.06	116.93	
15	50.19	39.05	30.68	49.77	36.94	24.18	
30	20.39	14.66	10.75	21.73	11.31	6.62	
45	9.66	6.12	3.91	9.26	4.68	3.73	
60	5.34	3.42	2.58	5.82	3.37	3.29	
90	3.01	2.17	2.19	2.89	3.36	2.80	
120	2.20	2.18	2.22	2.46	2.50	2.82	
180	1.76	2.19	2.60	3.34	2.91	2.42	
240	1.74	2.16	1.77	3.03	1.95	1.87	
360	1.75	1.72	1.74	2.11	1.89	2.31	

	N.A. (mg KOH/g)						
Tiempo (min)	Lipozyme [®] RM IM			Lip	Lipozyme [®] TL IM		
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C	
0	120.52	117.96	112.99	128.68	117.24	124.49	
15	52.99	45.35	35.48	87.82	73.35	80.79	
30	18.77	16.21	8.85	57.12	35.96	44.91	
45	9.85	6.66	4.33	32.59	17.31	22.45	
60	6.14	4.85		18.18	7.94	11.43	
90	3.45	3.08	3.03	5.82	4.59	4.16	
120	3.55	3.13	3.12	5.00	2.93	2.90	
180	3.02	3.11	2.62	3.81	2.52	2.08	
240	2.65	2.15	2.63	3.77	2.08	2.11	
360	2.64	2.22	2.21	2.09	1.64	1.65	

_	Conversión (%)						
Tiempo (min)	С	alB immo Plu	us	Ν	Novozym [®] 435		
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	58.70	68.62	75.49	62.03	68.71	79.32	
30	83.22	88.22	91.42	83.42	90.42	94.34	
45	92.05	95.08	96.87	92.94	96.03	96.81	
60	95.60	97.25	97.94	95.56	97.14	97.19	
90	97.52	98.25	98.25	97.80	97.15	97.60	
120	98.19	98.25	98.23	98.13	97.89	97.58	
180	98.55	98.24	97.92	97.45	97.54	97.93	
240	98.57	98.27	98.59	97.69	98.35	98.40	
360	98.56	98.62	98.61	98.39	98.40	98.02	

Tabla III.34- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en un reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de CalB immo Plus, Novozym[®] 435 y Lipozyme[®] RM IM y 1 g de Lipozyme[®] TL IM.

			Conversi	ión (%)			
Tiempo (min)	Lipozyme [®] RM IM			Lip	Lipozyme [®] TL IM		
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	56.03	61.56	68.60	31.75	37.44	35.11	
30	84.43	86.26	92.17	55.61	69.33	63.93	
45	91.83	94.35	96.17	74.67	85.23	81.97	
60	94.90	95.89		85.87	93.22	90.82	
90	97.14	97.39	97.32	95.48	96.09	96.66	
120	97.06	97.34	97.24	96.11	97.50	97.67	
180	97.49	97.37	97.68	97.04	97.85	98.33	
240	97.80	98.17	97.68	97.07	98.22	98.30	
360	97.81	98.12	98.05	98.38	98.60	98.67	

Estudio de la reutilización de los biocatalizadores.

Tabla III.35- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas en un reactor de altas prestaciones utilizando el mismo derivado inmovilizado en ciclos consecutivos de 60 min.

	CalB im	imo Plus	Novozy	Novozym [®] 435		
Usos	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)		
1°	122.51	4.51	122.28	4.50		
2°	117.61	5.26	125.16	4.95		
3°	124.93	5.27	126.25	4.39		
4°	118.90	5.42	125.24	5.17		
5°	123.18	4.97	124.54	4.96		
б°	124.51	5.06	123.50	4.57		
7°	122.06	5.63	123.06	4.91		
8°	130.65	5.23	129.30	5.32		
9°	133.07	5.20	125.66	5.29		
10°	128.54	5.47	123.30	5.51		
11°	123.30	6.12	123.11	5.07		
12°	127.63	5.12	128.34	5.60		
13°	115.55	5.58	122.01	5.57		
14°	115.32	5.26	119.91	5.32		
15°	125.74	5.79	123.29	6.19		

	Lipozyme	[®] RM IM	Lipozym	Lipozyme [®] TL IM		
Usos	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)		
1°	126.66	4.91	126.94	8.18		
2°	122.99	4.43	121.73	8.36		
3°	127.72	4.78	131.80	8.77		
4°	124.14	4.89	130.97	8.03		
5°	122.17	5.12	125.61	7.03		
б°	122.05	5.11	127.36	7.05		
7°	121.23	5.18	125.39	6.79		
8°	118.86	5.27	120.18	6.31		
9°	123.94	5.77	121.93	7.16		
10°	124.37	5.73	124.22	7.21		
11°	123.93	5.23	121.23	7.09		
12°	121.09	5.28	119.30	7.21		
13°	122.30	5.75	124.49	7.14		
14°	122.28	5.32	120.49	7.18		
15°	123.66	5.30	122.99	7.55		

T	Conversión (%)					
Usos	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM		
1°	96.32	96.32	96.12	93.55		
2°	95.53	96.05	96.40	93.13		
3°	95.78	96.53	96.26	93.34		
4°	95.44	95.87	96.06	93.87		
5°	95.96	96.02	95.81	94.41		
6°	95.94	96.30	95.81	94.47		
7°	95.39	96.01	95.73	94.59		
8°	96.00	95.89	95.56	94.75		
9°	96.10	95.79	95.34	94.13		
10°	95.74	95.53	95.39	94.19		
11°	95.04	95.89	95.78	94.15		
12°	95.99	95.63	95.64	93.95		
13°	95.17	95.44	95.29	94.26		
14°	95.44	95.56	95.65	94.04		
15°	95.39	94.98	95.71	93.86		

Tabla III.36- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas en un reactor de altas prestaciones utilizando el mismo derivado inmovilizado en ciclos consecutivos de 60 min.

Anexo IV

Resultados del análisis de proteínas por el método de Lowry durante la inmovilización de Lipozyme® CALB L.

Rectas de calibrado.

Tabla IV.1- Calibrado para la determinación del contenido en proteínas por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino (medidas realizadas a 650 nm).

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.0150	0.0460	0.0902	0.2870
0.0226	0.0698	0.0902	0.2868
0.0301	0.1037	0.1053	0.3326
0.0301	0.0974	0.1053	0.3373
0.0451	0.1433	0.1203	0.3628
0.0451	0.1492	0.1203	0.3829
0.0602	0.1956	0.1354	0.4218
0.0602	0.2022	0.1504	0.4665
0.0752	0.2362	0.1654	0.5077
0.0752	0.2428		



Figura IV.1- Recta de calibrado para el análisis de proteínas por el método de Lowry. $A = 3.1373 \times C; r^2 = 0.9972$

- 270 -

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.0151	0.0420
0.0301	0.0992
0.0452	0.1521
0.0452	0.1512
0.0753	0.2470
0.0753	0.2492
0.1054	0.3527
0.1054	0.3478
0.1355	0.4439
0.1355	0.4379
0.1656	0.5485

Tabla IV.2- Calibrado para la determinación del contenido en proteínas por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino en presencia de NaCl para la inmovilización por enlace covalente (medidas realizadas a 650 nm).



Figura IV.2- Recta de calibrado para el análisis de proteínas por el método de Lowry en presencia de NaCl. $A = 3.2936 \times C; r^2 = 0.9992$

Donde: A es la absorbancia y C la concentración de albúmina (mg/mL).

Selección del activador para la adsorción.

Tabla IV.3- Resultados de la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre 5 g de Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH empleando diferentes concentraciones de etanol como activador.

Activador	Proteína a inmovilizar (mg)	Biocatalizador seco recuperado (g)	Rendimiento de inmovilización (%)	Carga enzimática (mg _p /g)
Agua destilada	251.3	2.69	44.5	41.6
Etanol 10% (v/v)	293.6	2.34	61.3	77.1
Etanol puro	293.6	2.57	62.5	71.5

Tabla IV.4- Resultados de la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre 5 g de AmberliteTM XADTM 1180 empleando diferentes concentraciones de etanol como activador.

Activador	Proteína a inmovilizar (mg)	Biocatalizador seco recuperado (g)	Rendimiento de inmovilización (%)	Carga enzimática (mg _p /g)
Agua destilada	265.1	2.03	77.5	101.3
Etanol 10% (v/v)	362.2	1.98	72.5	132.8
Etanol puro	384.2	2.17	70.5	124.6

Inmovilización sobre Lewatit® VP OC 1064 MD PH.

Tabla IV.5- Resultados promedio del contenido en proteínas de las diferentes disoluciones implicadas en la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre Lewatit[®] VP OC 1064 MD PH.

Muestra a analizar	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la disolución (mL)	Cantidad de proteína presente (mg)
Disolución de Lipozyme [®] CALB L	13.93 ± 0.92	75.0 ± 0.0	1044.8 ± 69.1
Sobrenadante	6.00 ± 0.84	73.9 ± 0.7	444.1 ± 65.8
1 ^{er} lavado	1.01 ± 0.11	75.8 ± 0.75	76.5 ± 8.2
2º lavado	0.14 ± 0.02	$69.5\ \pm 0.8$	9.5 ± 1.3
Proteína inmovilizada (mg)		Biocatalizador seco recuperado (g)	
514.7 ± 1	8.6	7.18	3 ± 0.34

Inmovilización sobre Amberlite™ XAD™ 1180.

Tabla IV.6- Resultados promedio del contenido en proteínas de las diferentes disoluciones implicadas en la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre AmberliteTM XADTM 1180.

Muestra a analizar	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la disolución (mL)	Cantidad de proteína presente (mg)
Disolución de Lipozyme [®] CALB L	14.34 ± 0.29	50.0 ± 0.0	717.2 ± 14.6
Sobrenadante	3.14 ± 0.11	47.0 ± 0.4	147.5 ± 4.1
1 ^{er} lavado	0.91 ± 0.06	51.2 ± 1.4	46.7 ± 3.4
2º lavado	0.16 ± 0.04	45.6 ± 0.7	7.1 ± 1.7
Proteína inmovilizada (mg)		Biocatalizador	seco recuperado (g)
515.9 ± 18.1		4.47	7 ± 0.21

Inmovilización sobre Purolite[®] Lifetech[™] ECR 1090 M.

Tabla IV.7- Resultados promedio del contenido en proteínas de las diferentes disoluciones implicadas en la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre Purolite[®] LifetechTM ECR 1090 M.

Muestra a analizar	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la disolución (mL)	Cantidad de proteína presente (mg)
Disolución de Lipozyme [®] CALB L	13.39 ± 0.95	50.0 ± 0.0	669.3 ± 47.5
Sobrenadante	3.01 ± 0.43	47.1 ± 1.1	141.4 ± 19.5
1 ^{er} lavado	0.68 ± 0.15	51.0 ± 0.4	34.7 ± 7.9
2º lavado	0.17 ± 0.03	$48.2\ \pm 0.4$	8.4 ± 1.5
Proteína inmovi	lizada (mg)	Biocatalizador	seco recuperado (g)
484.9 ± 2	29.5	3.95	5 ± 0.02

Inmovilización sobre Purolite[®] Lifetech[™] ECR 8806 M.

Tabla IV.8- Resultados promedio del contenido en proteínas de las diferentes disoluciones implicadas en la inmovilización por adsorción física de Lipozyme[®] CALB L sobre Purolite[®] LifetechTM ECR 8806 M.

Muestra a analizar	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la disolución (mL)	Cantidad de proteína presente (mg)
Disolución de Lipozyme [®] CALB L	12.29 ± 0.13	50.0 ± 0.0	614.4 ± 6.7
Sobrenadante	3.15 ± 0.28	49.1 ± 0.4	154.4 ± 13.4
1 ^{er} lavado	0.54 ± 0.04	50.6 ± 0.5	27.5 ± 2.3
2º lavado	0.13 ± 0.02	$48.2\ \pm 0.6$	6.4 ± 0.8
Proteína inmovi	lizada (mg)	Biocatalizador	seco recuperado (g)
426.1 ±	9.7	5.06	5 ± 0.05

Inmovilización sobre Purolite® Lifetech™ ECR 8285 M.

Tabla IV.9- Resultados promedio del contenido en proteínas de las diferentes disolucionesimplicadasenlainmovilizacióncovalentedeLipozyme[®] CALB LsobrePurolite[®] LifetechTM ECR 8285 M.

Muestra a analizar	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la disolución (mL)	Cantidad de proteína presente (mg)
Disolución de Lipozyme [®] CALB L	12.08 ± 0.21	50.0 ± 0.0	604.3 ± 10.4
Sobrenadante	3.01 ± 0.24	47.9 ± 1.5	144.4 ± 11.9
1 ^{er} lavado	0.64 ± 0.05	50.8 ± 1.4	32.6 ± 2.7
2º lavado	0.17 ± 0.01	$48.9\ \pm 0.4$	8.3 ± 0.3
Proteína inmovilizada (mg)		Biocatalizador seco recuperado (g)	
419.0 ± 21.3		3.3	7 ± 0.08

Anexo V

Resultados de la experimentación en un reactor abierto a la atmósfera empleando derivados inmovilizados de Lipozyme® CALB L.

Comprobación de la actividad de los biocatalizadores desarrollados en el laboratorio.

Tabla V.1- Número ácido de las muestras tomadas en los ensayos realizados en un reactor abierto para la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 1 g de biocatalizador.

Tiempo	N.A. (mg KOH/g)					
(min)	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M	
0	125.92	128.22	131.24	124.59	123.96	
5	99.72	102.69	58.67	62.57	56.23	
10	72.97	58.66	36.57	36.19	26.19	
15	51.31	36.85	26.38	28.61	17.70	
20	35.74	24.08	19.97	20.14	15.34	
30	18.35	10.00	10.34	14.51	13.43	
40	9.85	6.30	6.86	10.20	11.51	
50	6.42	5.43	5.67	7.39	9.57	
60	4.75	5.50	5.19	6.54	7.65	
90	4.46	3.57	4.79	5.25	4.80	
120	3.75	4.07	4.36	4.51	4.31	
180	3.57	3.35	4.32	4.84	4.30	

Tabla V.2- Conversión alcanzada durante los ensayos realizados en un reactor abierto para la síntesis de miristato de cetilo a 60 °C y 350 rpm con 1 g de biocatalizador.

Tiempo Conversión (%)					
(min)	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	20.80	19.91	55.30	49.78	54.64
10	42.05	54.25	72.13	70.96	78.87
15	59.25	71.26	79.90	77.03	85.72
20	71.62	81.22	84.78	83.84	87.62
30	85.43	92.20	92.12	88.35	89.17
40	92.18	95.09	94.77	91.81	90.72
50	94.90	95.76	95.68	94.07	92.28
60	96.23	95.71	96.05	94.75	93.83
90	96.46	97.22	96.35	95.78	96.12
120	97.02	96.83	96.68	96.38	96.52
180	97.17	97.39	96.71	96.12	96.53

Estudio de la desorción de lipasa en el medio de reacción.

Tabla V.3- Número ácido de las muestras tomadas en los ensayos realizados en un reactor abierto con ácido mirístico y alcohol cetílico a 70 °C, 350 rpm e incubando previamente 0.5 g de biocatalizador durante 60 min.

Tiempo	N.A. (mg KOH/g)						
(min)	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M		
0	135.19	136.98	144.53	136.47	136.80		
60	135.16	137.09	144.92	137.01	134.27		
180	134.32	137.84	143.15	134.53	134.41		
360	132.87	134.31	141.92	132.46	132.91		

Anexo VI

Resultados de la experimentación en un reactor de altas prestaciones empleando derivados inmovilizados de Lipozyme® CALB L.

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: Lewatit.

Tabla VI.1- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)						
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	124.26	123.71	122.55	126.73	125.67		
15	112.24	91.67	58.85	22.71	23.23		
30	101.45	71.70	25.65	7.03	7.74		
45	93.98	49.99	9.84	3.40	4.72		
60	83.93	34.07	4.73	2.47	3.07		
90	63.05	11.49	2.64	2.14	2.21		
120	38.67	5.33	2.21	1.80	1.71		
180	10.79	2.69	1.76	1.67	1.79		
240	3.57	1.76	1.77	1.63	1.77		
360	2.21	1.75	1.67	1.65	1.72		

Tabla VI.2- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tioner o (min)	Conversión (%)						
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
15	9.67	25.90	51.98	82.08	81.52		
30	18.35	42.04	79.07	94.45	93.84		
45	24.36	59.59	91.97	97.32	96.25		
60	32.45	72.46	96.14	98.05	97.56		
90	49.26	90.71	97.85	98.31	98.24		
120	68.88	95.69	98.19	98.58	98.64		
180	91.31	97.83	98.57	98.68	98.58		
240	97.13	98.58	98.55	98.71	98.59		
360	98.22	98.59	98.64	98.70	98.63		

Tabla VI.3- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)						
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	120.97	122.20	129.33	124.03	121.79		
15	110.52	93.23	61.33	31.14	23.52		
30	102.77	66.52	26.60	8.19	9.81		
45	94.42	48.50	11.39	4.24	5.22		
60	84.06	29.86	5.76	3.15	3.08		
90	65.97	12.44	3.21	2.19	2.25		
120	48.13	5.48	2.54	2.09	2.22		
180	16.56	2.76	1.81	1.76	1.89		
240	5.72	2.26	1.74	2.12	1.92		
360	2.63	1.87	1.77	1.71	1.84		

Tabla VI.4- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

T :	Conversión (%)						
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
15	8.63	23.71	52.58	74.90	80.69		
30	15.04	45.56	79.43	93.39	91.95		
45	21.94	60.31	91.20	96.58	95.71		
60	30.51	75.57	95.54	97.46	97.47		
90	45.47	89.82	97.52	98.24	98.15		
120	60.21	95.51	98.03	98.32	98.18		
180	86.31	97.74	98.60	98.58	98.45		
240	95.27	98.15	98.66	98.29	98.43		
360	97.83	98.47	98.63	98.62	98.49		

Tabla VI.5- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)					
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	119.12	115.83	109.69	120.43	126.02	
15	108.86	86.47	53.93	27.15	23.32	
30	100.43	62.04	24.63	8.24	11.97	
45	92.46	42.19	8.96	3.88	6.41	
60	83.20	26.10	5.24	2.49	3.50	
90	64.64	9.87	2.61	1.78	3.10	
120	44.95	4.67	2.22	1.71	2.13	
180	17.10	2.59	1.69	1.71	2.23	
240	5.94	2.20	1.72	1.30	1.77	
360	2.70	1.72	1.76	1.27	1.73	

Tabla VI.6- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

T :	Conversión (%)						
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
15	8.62	25.34	50.83	77.46	81.49		
30	15.69	46.44	77.55	93.16	90.50		
45	22.38	63.57	91.84	96.78	94.91		
60	30.15	77.46	95.22	97.93	97.22		
90	45.73	91.47	97.62	98.52	97.54		
120	62.27	95.97	97.97	98.58	98.31		
180	85.64	97.76	98.46	98.58	98.23		
240	95.01	98.10	98.43	98.92	98.59		
360	97.73	98.52	98.40	98.95	98.62		

Tabla VI.7- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)						
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	109.45	111.13	109.05	112.96	112.51		
15	97.74	85.92	57.57	29.22	22.40		
30	90.18	64.79	27.63	11.22	10.40		
45	79.24	45.89	10.75	4.20	5.78		
60	69.47	31.27	5.70	3.52	4.01		
90	52.38	12.21	3.13	2.64	3.07		
120	35.48	6.32	2.64	2.27	2.20		
180	12.78	2.70	2.11	2.25	1.77		
240	5.11	2.19	2.20	2.16	1.70		
360	2.71	1.76	2.15	1.81	1.81		

Tabla VI.8- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Lewatit: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 g.

T :	Conversión (%)						
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
15	10.70	22.69	47.21	74.13	80.09		
30	17.61	41.70	74.66	90.07	90.76		
45	27.60	58.71	90.15	96.28	94.86		
60	36.52	71.86	94.77	96.88	96.44		
90	52.14	89.01	97.13	97.66	97.27		
120	67.58	94.31	97.58	97.99	98.04		
180	88.32	97.57	98.06	98.01	98.42		
240	95.33	98.03	97.98	98.09	98.49		
360	97.52	98.42	98.03	98.40	98.39		

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: Amberlite.

Tabla VI.9- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	128.14	132.78	126.00	130.48
15	110.85	78.74	44.91	19.41
30	83.37	45.31	12.56	5.90
45	58.81	22.15	5.82	3.66
60	45.69	11.05	3.51	2.69
90	21.96	4.48	2.64	2.27
120	10.26	3.17	2.26	2.24
180	4.52	2.22	2.25	2.26
240	3.14	2.27	2.24	2.24
360	2.19	2.23	2.27	2.29

Tabla VI.10- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T!		Convers	ión (%)	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	13.49	40.70	64.36	85.13
30	34.94	65.88	90.03	95.48
45	54.11	83.32	95.38	97.19
60	64.35	91.67	97.22	97.94
90	82.87	96.63	97.90	98.26
120	91.99	97.61	98.20	98.28
180	96.47	98.32	98.21	98.27
240	97.55	98.29	98.22	98.28
360	98.29	98.32	98.20	98.25

Tabla VI.11- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g		
0	125.14	120.76	121.82	122.51		
15	100.60	83.33	45.94	18.50		
30	82.03	44.20	14.96	6.20		
45	61.18	27.09	6.31	3.57		
60	46.98	13.73	3.62	3.13		
90	23.61	5.42	2.71	2.24		
120	11.64	3.12	2.23	2.28		
180	4.54	2.26	2.22	2.25		
240	3.61	2.28	2.27	2.25		
360	2.68	2.26	2.24	2.27		

Tabla VI.12- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -		Convers	ión (%)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	19.61	31.00	62.29	84.90
30	34.45	63.40	87.72	94.94
45	51.11	77.57	94.82	97.09
60	62.45	88.63	97.03	97.44
90	81.13	95.52	97.77	98.17
120	90.70	97.42	98.17	98.14
180	96.37	98.13	98.18	98.16
240	97.12	98.12	98.14	98.17
360	97.86	98.13	98.16	98.14

Tabla VI.13- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	119.84	112.75	114.44	118.10
15	94.40	74.40	44.36	21.15
30	75.70	46.95	15.73	7.48
45	62.85	26.58	6.25	5.85
60	45.10	14.02	4.00	4.54
90	24.63	5.88	3.23	2.69
120	11.83	3.16	2.28	3.13
180	4.99	2.27	2.27	2.66
240	3.14	2.22	2.23	2.73
360	2.25	2.22	2.26	2.74

Tabla VI.14- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -		Convers	ión (%)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	21.23	34.01	61.24	82.10
30	36.83	58.36	86.25	93.67
45	47.55	76.42	94.54	95.04
60	62.36	87.57	96.51	96.15
90	79.45	94.78	97.18	97.72
120	90.13	97.20	98.01	97.35
180	95.83	97.99	98.02	97.75
240	97.38	98.03	98.05	97.69
360	98.13	98.03	98.02	97.68

Tabla VI.15- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	109.17	107.43	106.60	109.30
15	91.12	77.97	41.66	23.90
30	74.31	44.84	15.89	8.64
45	59.24	28.27	6.90	4.59
60	45.55	15.10	4.48	3.28
90	24.43	6.66	2.89	2.45
120	12.25	5.04	2.46	2.08
180	4.97	2.45	2.49	2.49
240	4.86	2.48	2.47	2.47
360	4.90	2.47	2.09	2.44

Tabla VI.16- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de Amberlite: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -		Convers	ión (%)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	16.54	27.43	60.92	78.13
30	31.94	58.26	85.09	92.10
45	45.74	73.68	93.52	95.80
60	58.28	85.95	95.79	97.00
90	77.63	93.80	97.28	97.76
120	88.78	95.31	97.69	98.09
180	95.45	97.72	97.67	97.72
240	95.55	97.69	97.69	97.74
360	95.51	97.70	98.04	97.77

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: ECR 1090 M.

Tabla VI.17- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiampa (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	123.19	130.19	127.16	126.36
15	99.89	56.14	25.21	19.42
30	80.88	20.30	7.46	8.30
45	50.45	7.29	4.40	4.39
60	25.27	4.84	3.09	3.49
90	7.42	3.47	2.64	2.63
120	4.34	2.59	2.64	2.60
180	2.62	2.17	2.20	2.20
240	2.15	2.16	2.20	2.19
360	2.17	2.15	1.76	2.18

Tabla VI.18- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Π :	Conversión (%)			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	18.91	56.88	80.17	84.63
30	34.34	84.41	94.13	93.43
45	59.05	94.40	96.54	96.53
60	79.48	96.28	97.57	97.24
90	93.98	97.33	97.92	97.92
120	96.48	98.01	97.92	97.94
180	97.87	98.33	98.27	98.26
240	98.26	98.34	98.27	98.26
360	98.24	98.35	98.62	98.28

Tabla VI.19- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	118.38	119.15	121.85	124.03
15	91.38	41.55	25.67	21.73
30	71.78	17.28	7.92	8.73
45	40.20	7.35	3.91	4.80
60	23.16	4.40	3.09	3.08
90	7.44	3.07	2.63	2.63
120	4.33	2.64	2.64	2.20
180	3.05	2.20	2.19	2.20
240	2.20	2.20	2.20	2.19
360	2.17	2.18	2.20	2.20

Tabla VI.20- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -		Convers	ión (%)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	22.80	65.13	78.94	82.48
30	39.36	85.50	93.50	92.96
45	66.04	93.83	96.79	96.13
60	80.43	96.30	97.47	97.51
90	93.72	97.42	97.84	97.88
120	96.34	97.78	97.83	98.23
180	97.43	98.16	98.20	98.23
240	98.14	98.16	98.19	98.23
360	98.16	98.17	98.19	98.22

Tabla VI.21- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	110.41	111.61	114.16	117.97
15	80.56	42.35	23.55	19.96
30	44.93	16.23	8.04	9.16
45	27.33	7.59	5.21	4.37
60	15.93	5.23	3.62	3.17
90	6.04	2.83	2.82	2.40
120	3.65	2.40	2.42	2.01
180	2.40	2.01	2.40	2.03
240	2.00	2.02	2.02	2.01
360	2.02	2.02	2.00	2.00

Tabla VI.22- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -		Convers	ión (%)	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	27.03	62.05	79.37	83.08
30	59.31	85.46	92.96	92.24
45	75.25	93.20	95.43	96.30
60	85.57	95.31	96.83	97.31
90	94.53	97.46	97.53	97.96
120	96.70	97.85	97.88	98.30
180	97.82	98.20	97.90	98.28
240	98.18	98.19	98.23	98.30
360	98.17	98.19	98.25	98.31

Tabla VI.23- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)		N.A. (mg	KOH/g)	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	114.00	114.31	118.30	116.88
15	83.79	47.51	28.53	22.24
30	48.28	20.36	10.77	10.06
45	29.62	9.29	5.93	6.45
60	16.74	6.45	4.75	5.21
90	7.63	4.45	4.39	4.05
120	5.19	3.64	3.62	3.62
180	3.22	2.79	2.80	3.23
240	2.42	2.42	2.42	2.83
360	2.02	2.02	3.63	2.02

Tabla VI.24- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 1090 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	Conversión (%)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	26.50	58.44	75.88	80.97
30	57.65	82.19	90.90	91.39
45	74.02	91.87	94.99	94.48
60	85.31	94.36	95.98	95.54
90	93.31	96.11	96.29	96.54
120	95.45	96.82	96.94	96.90
180	97.18	97.56	97.63	97.24
240	97.88	97.88	97.96	97.58
360	98.22	98.24	96.93	98.27

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: ECR 8806 M.

Tabla VI.25- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	N.A. (mg KOH/g)				
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	129.71	133.69	135.42	132.72	
15	88.82	46.25	25.05	20.53	
30	59.79	18.05	9.91	8.23	
45	34.19	8.12	4.99	4.97	
60	19.51	5.39	4.09	4.97	
90	7.79	4.11	3.64	3.98	
120	4.66	3.61	3.63	3.20	
180	3.45	3.15	3.17	3.18	
240	3.43	3.17	3.18	2.73	
360	2.98	2.70	2.72	2.73	

Tabla VI.26- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) –	Conversión (%)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	31.53	65.41	81.50	84.53
30	53.90	86.50	92.68	93.80
45	73.64	93.93	96.31	96.26
60	84.96	95.97	96.98	96.26
90	94.00	96.93	97.31	97.00
120	96.41	97.30	97.32	97.59
180	97.34	97.64	97.66	97.61
240	97.36	97.63	97.65	97.94
360	97.70	97.98	97.99	97.94

Tabla VI.27- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	N.A. (mg KOH/g)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	125.50	124.38	124.97	124.52
15	82.58	47.87	21.95	18.92
30	50.77	17.06	7.62	6.78
45	30.11	7.82	4.83	4.28
60	16.34	5.05	3.83	3.36
90	6.76	3.71	2.90	2.89
120	4.28	3.24	2.37	2.91
180	3.38	2.78	2.39	2.37
240	2.85	2.30	2.41	2.40
360	2.87	2.30	2.42	2.37

Tabla VI.28- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	Conversión (%)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	34.20	61.51	82.43	84.81
30	59.54	86.29	93.90	94.55
45	76.01	93.71	96.13	96.56
60	86.98	95.94	96.93	97.30
90	94.61	97.02	97.68	97.68
120	96.59	97.40	98.10	97.66
180	97.31	97.77	98.09	98.10
240	97.73	98.15	98.07	98.08
360	97.71	98.15	98.07	98.10

Tabla VI.29- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	N.A. (mg KOH/g)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	114.20	120.08	118.39	120.65
15	77.41	47.31	23.10	16.54
30	50.40	18.37	7.50	6.21
45	30.51	7.74	4.45	3.93
60	17.27	5.05	4.01	3.50
90	7.78	3.24	3.08	2.67
120	4.59	3.20	2.64	2.65
180	3.19	3.22	2.66	2.66
240	2.76	2.73	2.63	2.67
360	2.77	2.77	2.67	2.65

Tabla VI.30- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiempo (min) -	Conversión (%)			
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	32.21	60.60	80.49	86.29
30	55.87	84.70	93.66	94.85
45	73.28	93.56	96.24	96.74
60	84.88	95.79	96.61	97.10
90	93.19	97.30	97.40	97.79
120	95.98	97.34	97.77	97.80
180	97.21	97.32	97.76	97.79
240	97.58	97.73	97.78	97.79
360	97.57	97.70	97.75	97.80
Tabla VI.31- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	113.74	112.10	111.69	112.21	
15	75.59	43.23	24.57	17.60	
30	47.76	16.30	8.73	8.41	
45	31.35	7.78	5.36	5.13	
60	17.42	4.83	3.92	3.71	
90	7.23	3.42	3.39	2.80	
120	4.35	2.93	2.93	2.82	
180	3.43	2.95	2.88	2.79	
240	2.93	2.92	2.91	2.81	
360	2.93	2.94	2.40	2.35	

Tabla VI.32- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8806 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	33.55	61.43	78.00	84.32	
30	58.01	85.46	92.19	92.50	
45	72.44	93.06	95.20	95.43	
60	84.68	95.69	96.49	96.69	
90	93.64	96.95	96.96	97.50	
120	96.18	97.39	97.38	97.49	
180	96.98	97.37	97.42	97.51	
240	97.42	97.39	97.40	97.49	
360	97.42	97.37	97.85	97.90	

Influencia de la cantidad de biocatalizador en el medio: ECR 8285 M.

Tabla VI.33- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiampa (min)	N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	134.77	126.45	128.19	123.84	
15	116.57	55.79	20.46	17.60	
30	106.96	16.80	9.67	10.52	
45	97.67	7.69	5.79	6.15	
60	89.38	5.79	4.83	5.27	
90	59.26	4.36	3.86	3.95	
120	12.00	3.86	3.38	3.96	
180	3.77	3.38	3.39	3.94	
240	3.84	3.39	3.38	3.93	
360	2.36	3.38	3.38	3.95	

Tabla VI.34- Conversión alcanzada durante la síntesis de laurato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T :	Conversión (%)				
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	13.51	55.88	84.04	85.79	
30	20.63	86.71	92.45	91.50	
45	27.53	93.92	95.48	95.03	
60	33.68	95.42	96.23	95.74	
90	56.03	96.55	96.99	96.81	
120	91.09	96.95	97.36	96.80	
180	97.20	97.32	97.36	96.82	
240	97.15	97.32	97.37	96.82	
360	98.25	97.33	97.36	96.81	

Tabla VI.35- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiompo (min)	N.A. (mg KOH/g)			
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	128.68	125.84	126.00	125.15
15	101.11	42.72	21.91	17.40
30	82.60	14.95	10.22	11.14
45	60.68	6.95	6.03	6.97
60	31.82	5.11	4.64	5.12
90	8.46	4.17	4.18	4.18
120	4.69	3.70	3.72	3.72
180	4.23	3.70	3.71	3.72
240	3.77	3.71	3.72	3.72
360	3.75	3.71	3.71	3.72

Tabla VI.36- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

T!	Conversión (%)				
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	21.43	66.06	82.61	86.09	
30	35.81	88.12	91.89	91.10	
45	52.84	94.48	95.21	94.43	
60	75.27	95.94	96.32	95.91	
90	93.43	96.68	96.68	96.66	
120	96.36	97.06	97.05	97.03	
180	96.71	97.06	97.05	97.03	
240	97.07	97.05	97.05	97.03	
360	97.09	97.05	97.05	97.03	

Tabla VI.37- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	121.86	121.26	122.85	121.16	
15	100.73	56.73	20.53	16.52	
30	86.13	19.26	11.38	11.47	
45	66.14	7.74	5.92	7.93	
60	40.90	5.01	4.55	5.29	
90	11.35	4.10	4.09	3.97	
120	5.46	3.64	3.64	3.09	
180	4.10	3.64	3.18	2.64	
240	3.19	3.19	3.18	2.65	
360	3.19	3.19	2.73	2.64	

Tabla VI.38- Conversión alcanzada durante la síntesis de palmitato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min) -	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	17.34	53.21	83.29	86.36	
30	29.33	84.11	90.74	90.53	
45	45.73	93.62	95.18	93.46	
60	66.44	95.87	96.30	95.64	
90	90.69	96.62	96.67	96.73	
120	95.52	97.00	97.04	97.45	
180	96.64	97.00	97.41	97.82	
240	97.39	97.37	97.41	97.82	
360	97.38	97.37	97.78	97.82	

Tabla VI.39- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

Tiomno (min)	N.A. (mg KOH/g)				
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	121.01	118.81	121.31	118.43	
15	96.81	50.48	24.29	17.81	
30	68.38	18.70	11.89	10.97	
45	35.29	8.82	6.62	7.63	
60	16.56	5.29	4.85	5.72	
90	6.61	3.52	3.52	4.28	
120	4.40	3.52	3.09	3.34	
180	3.97	3.08	3.08	3.34	
240	3.53	3.08	3.09	3.34	
360	3.53	3.08	3.08	3.34	

Tabla VI.40- Conversión alcanzada durante la síntesis de estearato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C y 350 rpm, con diferentes cantidades de ECR 8285 M: 0.125, 0.25, 0.5 y 1 g.

	Conversión (%)				
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
15	20.00	57.51	79.97	84.96	
30	43.50	84.26	90.20	90.74	
45	70.84	92.58	94.54	93.56	
60	86.31	95.55	96.00	95.17	
90	94.53	97.03	97.10	96.38	
120	96.36	97.04	97.45	97.18	
180	96.72	97.40	97.46	97.18	
240	97.09	97.40	97.45	97.18	
360	97.08	97.40	97.46	97.18	

Influencia de la temperatura de operación.

Tabla VI.41- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en un reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Lewatit y Amberlite y 0.25 g de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M.

_	N.A. (mg KOH/g)					
Tiempo (min)		Lewatit			Amberlite	
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	120.99	120.50	120.08	118.24	121.05	121.90
15	87.16	61.98	54.90	49.76	42.75	31.85
30	45.57	23.09	15.71	21.08	15.10	9.28
45	21.35	8.89	6.69	8.89	6.29	4.01
60	9.32	4.90	4.47	5.40	3.98	2.69
90	3.70	3.96	2.64	3.11	2.26	2.21
120	2.79	3.11	2.23	2.23	2.27	2.21
180	2.31	2.76	1.75	2.26	2.24	1.80
240	1.84	2.65	1.76	2.20	1.80	1.81
360	1.84	2.66	1.75	2.25	1.80	1.80

			N.A. (mg	KOH/g)		
Tiempo (min)		ECR 1090 M		ECR 8806 M		
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	121.76	118.86	121.27	120.08	125.12	125.49
15	61.65	51.82	45.07	55.70	46.94	37.97
30	29.22	19.13	13.80	26.30	16.49	12.40
45	12.43	8.42	6.04	11.27	7.63	6.07
60	7.93	5.54	4.63	6.55	5.38	4.22
90	5.11	4.15	3.71	4.18	3.65	3.26
120	3.73	3.23	3.27	3.31	3.14	3.29
180	3.25	2.77	2.79	2.82	3.18	2.82
240	2.78	2.80	2.78	2.35	2.74	2.83
360	2.81	2.34	2.33	2.32	2.70	2.82

		N.A. (mg KOH/g)	
Tiempo (min)		ECR 8285 M	
	60 °C	70 °C	80 °C
0	120.95	124.35	122.59
15	52.17	42.79	34.52
30	21.34	14.21	10.67
45	10.00	6.67	4.78
60	6.67	4.28	3.80
90	3.82	3.82	3.34
120	3.34	3.80	3.34
180	3.34	3.34	3.34
240	3.34	2.86	3.33
360	3.34	2.86	3.33

Tabla VI.41- Continuación.

Tabla VI.42- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en un reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Lewatit y Amberlite y 0.25 g de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M.

	Conversión (%)								
Tiempo (min)		Lewatit		Amberlite					
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C			
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
15	27.96	48.56	54.28	57.91	64.68	73.87			
30	62.34	80.84	86.92	82.17	87.52	92.39			
45	82.35	92.62	94.43	92.48	94.81	96.71			
60	92.30	95.93	96.27	95.43	96.71	97.79			
90	96.94	96.72	97.80	97.37	98.13	98.19			
120	97.70	97.42	98.14	98.11	98.12	98.18			
180	98.09	97.71	98.55	98.09	98.15	98.52			
240	98.48	97.80	98.54	98.14	98.51	98.52			
360	98.48	97.79	98.54	98.10	98.51	98.53			

	Conversión (%)							
Tiempo (min)	ECR 1090 M				ECR 8806 M			
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
15	49.37	56.40	62.83	53.61	62.49	69.75		
30	76.00	83.91	88.62	78.10	86.82	90.12		
45	89.79	92.92	95.02	90.61	93.90	95.17		
60	93.49	95.33	96.18	94.54	95.70	96.63		
90	95.80	96.50	96.94	96.52	97.08	97.40		
120	96.94	97.28	97.30	97.24	97.49	97.38		
180	97.33	97.67	97.70	97.65	97.46	97.75		
240	97.72	97.64	97.71	98.04	97.81	97.74		
360	97.69	98.03	98.07	98.06	97.84	97.75		

Tabla VI.42- Continuación.

		Conversión (%)	
Tiempo (min)		ECR 8285 M	
-	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.00	0.00	0.00
15	56.86	65.59	71.84
30	82.35	88.57	91.29
45	91.73	94.63	96.10
60	94.49	96.55	96.90
90	96.84	96.93	97.28
120	97.24	96.94	97.28
180	97.24	97.32	97.28
240	97.24	97.70	97.28
360	97.24	97.70	97.28

Estudio de la estabilidad al almacenamiento.

Tabla VI.43- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C, 350 rpm y 0.25 g de Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M tras diferentes tiempos de almacenamiento.

T .				N.A. (mg	KOH/g)			
Tiempo (min)	Lewatit				Amberlite			
(11111)	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses
0	122.84	112.15	126.22	130.95	126.17	122.73	129.09	125.41
15	107.45	94.15	106.28	107.69	77.02	72.63	72.25	79.39
30	81.34	71.35	74.05	82.96	39.81	33.15	36.35	40.61
45	56.26	51.04	52.14	58.74	17.37	14.87	16.90	18.86
60	33.75	36.62	32.04	36.24	8.72	6.96	8.37	9.50
90	11.33	19.08	11.30	11.76	3.91	3.50	5.06	4.80
120	4.67	8.33	5.43	5.91	2.64	3.02	4.20	3.79
180	2.25	2.36	2.59	2.54	1.85	2.65	3.28	3.36
240	1.82	1.82	2.21	2.12	2.14	2.62	2.77	3.37
360	1.72	1.87	1.73	1.69	1.66	2.55	2.77	3.34

T				N.A. (mg	KOH/g)			
Tiempo (min)	ECR 1090 M				ECR 8806 M			
(11111)	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses
0	122.90	120.95	123.82	126.83	117.82	121.78	124.81	126.60
15	36.09	31.51	33.40	32.08	40.23	43.48	41.16	46.50
30	10.82	11.09	15.28	13.23	13.97	15.61	15.59	16.55
45	4.49	5.02	6.30	6.04	6.29	7.02	6.69	7.47
60	3.08	4.19	5.34	4.64	3.86	4.49	4.76	5.11
90	2.66	2.35	3.35	3.21	3.34	2.60	4.26	3.65
120	1.77	2.30	2.84	2.82	2.91	2.24	3.33	3.25
180	1.77	1.81	2.84	2.82	1.70	1.78	3.34	3.21
240	1.78	1.81	2.88	2.78	1.24	2.19	3.38	2.77
360	1.34	1.34	2.84	2.34	1.23	1.78	2.85	2.75

T .	N.A. (mg KOH/g)							
(min)	ECR 8285 M							
(11111) -	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses				
0	117.56	126.21	126.91	126.47				
15	36.66	58.65	48.69	52.30				
30	10.77	17.19	16.73	18.54				
45	5.12	6.29	7.59	7.46				
60	3.27	3.51	5.19	4.67				
90	2.10	2.22	3.85	3.27				
120	1.63	2.16	3.33	2.78				
180	1.70	1.76	2.81	2.81				
240	1.66	1.74	2.87	2.79				
360	1.68	1.76	2.85	2.35				

Tabla VI.43- Continuación.

Tabla VI.44- Conversión alcanzada durante la síntesis de miristato de cetilo en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C, 350 rpm y 0.25 g de Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M tras diferentes tiempos de almacenamiento.

7 .				Convers	ión (%)			
Tiempo (min)	Lewatit				Amberlite			
(11111)	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	12.53	16.05	15.79	17.77	38.96	40.82	44.03	36.69
30	33.79	36.38	41.34	36.65	68.44	72.99	71.84	67.62
45	54.20	54.49	58.69	55.14	86.23	87.89	86.90	84.96
60	72.52	67.34	74.62	72.33	93.09	94.33	93.52	92.43
90	90.78	82.99	91.04	91.02	96.90	97.15	96.08	96.17
120	96.20	92.57	95.70	95.49	97.91	97.54	96.74	96.98
180	98.17	97.89	97.95	98.06	98.54	97.84	97.46	97.32
240	98.52	98.37	98.25	98.38	98.30	97.87	97.85	97.31
360	98.60	98.33	98.63	98.71	98.69	97.93	97.86	97.34

—				Convers	ión (%)			
Tiempo (min)	ECR 1090 M				ECR 8806 M			
(IIIII)	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	70.63	73.95	73.02	74.71	65.85	64.29	67.02	63.27
30	91.19	90.83	87.66	89.57	88.15	87.18	87.51	86.93
45	96.34	95.85	94.91	95.24	94.66	94.23	94.64	94.10
60	97.49	96.53	95.69	96.34	96.73	96.31	96.18	95.96
90	97.84	98.06	97.30	97.47	97.17	97.86	96.58	97.12
120	98.56	98.10	97.71	97.78	97.53	98.16	97.33	97.43
180	98.56	98.51	97.70	97.77	98.56	98.54	97.32	97.47
240	98.55	98.50	97.68	97.81	98.95	98.20	97.29	97.81
360	98.91	98.89	97.70	98.16	98.96	98.54	97.71	97.83

Tabla VI.44- Continuación.

	Conversión (%)								
Tiempo =	ECR 8285 M								
(IIIII)	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses					
0	0.00	0.00	0.00	0.00					
15	68.82	53.53	61.64	58.65					
30	90.84	86.38	86.82	85.34					
45	95.64	95.01	94.02	94.10					
60	97.22	97.22	95.91	96.31					
90	98.22	98.24	96.97	97.41					
120	98.61	98.29	97.38	97.80					
180	98.56	98.60	97.78	97.78					
240	98.59	98.62	97.74	97.79					
360	98.57	98.61	97.76	98.14					

Estudio de la reutilización de los biocatalizadores.

Tabla VI.45- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas en un reactor de altas prestaciones utilizando el mismo derivado inmovilizado en ciclos consecutivos de 60 min.

	Lev	vatit	ECR 1090 M		
Usos	N.A. inicialN.A. final(mg KOH/g)(mg KOH/g)		N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	
1°	121.97	7.93	123.38	4.12	
2°	123.66	7.00	124.03	3.67	
3°	124.26	7.06	126.94	5.62	
4°	121.32	8.64	121.51	52.65	
5°	124.03	12.02	120.71	110.35	
6°	112.89	40.11			
7°	124.58	97.80			

	Amb	erlite	ECR 8	8806 M	ECR 8285 M		
Usos	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	N.A. inicial (mg KOH/g)	N.A. final (mg KOH/g)	
1°	121.85	4.60	124.53	5.30	119.25	4.39	
2°	122.23	4.15	124.36	5.71	121.13	4.37	
3°	122.03	4.16	121.43	5.11	121.89	4.40	
4°	121.41	4.10	120.86	6.09	121.57	4.89	
5°	124.23	4.06	122.15	5.94	122.88	4.83	
6°	124.06	4.00	123.66	6.45	123.48	4.85	
7°	123.57	3.94	121.87	6.47	120.06	5.74	
8°	120.98	4.29	120.52	6.90	121.64	6.52	
9°	118.70	4.31	123.43	7.38	121.91	8.31	
10°	122.53	4.29	123.80	7.76	121.45	25.58	
11°	124.89	3.91	123.07	8.26	125.05	75.29	
12°	122.68	4.79	122.97	8.62			
13°	121.34	4.35	124.17	9.97			
14°	119.79	4.64	120.40	10.41			
15°	122.69	4.21	125.38	11.76			

T In a n			Conversión (%)	
USOS	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
1°	93.50	96.23	96.66	95.75	96.32
2°	94.34	96.61	97.04	95.41	96.39
3°	94.32	96.59	95.57	95.79	96.39
4°	92.88	96.62	56.67	94.96	95.98
5°	90.31	96.73	8.58	95.14	96.07
6°	64.47	96.78		94.79	96.07
7°	21.50	96.81		94.69	95.22
8°		96.46		94.28	94.64
9°		96.37		94.02	93.18
10°		96.50		93.73	78.94
11°		96.87		93.29	39.79
12°		96.10		92.99	
13°		96.41		91.97	
14°		96.12		91.35	
15°		96.57		90.62	

Tabla VI.46- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas en un reactor de altas prestaciones utilizando el mismo derivado inmovilizado en ciclos consecutivos de 60 min.

Influencia de la velocidad de agitación.

Tabla VI.47- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti a diferentes velocidades de agitación en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C con 0.5 g de Lewatit y Amberlite y 0.25 g de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M.

	N.A. (mg KOH/g)					
Tiempo (min)		Lewatit			Amberlite	
	150 rpm	250 rpm	350 rpm	150 rpm	250 rpm	350 rpm
0	122.03	123.36	120.50	126.80	123.33	121.05
15	73.41	71.18	61.98	68.95	45.42	42.75
30	44.87	30.43	23.09	53.08	20.57	15.10
45	30.66	14.53	8.89	40.25	10.65	6.29
60	22.14	8.80	4.90	30.12	6.88	3.98
90	11.17	4.62	3.96	17.81	4.14	2.26
120	7.33	3.73	3.11	11.30	3.68	2.27
180	5.58	3.23	2.76	6.84	3.21	2.24
240	3.66	3.24	2.65	4.56	3.24	1.80
360	2.78	2.73	2.66	3.62	2.73	1.80

	N.A. (mg KOH/g)					
Tiempo (min)		ECR 1090 M]	ECR 8806 M	[
	150 rpm	250 rpm	350 rpm	150 rpm	250 rpm	350 rpm
0	125.69	123.38	118.86	125.04	123.96	125.12
15	67.17	44.88	51.82	72.63	49.53	46.94
30	47.90	23.96	19.13	52.27	21.38	16.49
45	32.47	8.86	8.42	39.96	10.81	7.63
60	21.76	5.59	5.54	29.87	6.85	5.38
90	11.78	3.76	4.15	16.10	4.43	3.65
120	7.96	3.28	3.23	10.22	3.40	3.14
180	5.50	3.23	2.77	5.87	2.91	3.18
240	4.60	2.81	2.80	4.38	2.93	2.74
360	4.15	2.33	2.34	3.43	2.93	2.70

Tabla VI.47- Continuación.

	N.A. (mg KOH/g)					
Tiempo (min)		ECR 8285 M				
	60 °C	70 °C	80 °C			
0	124.65	125.87	124.35			
15	64.48	56.55	42.79			
30	42.36	29.29	14.21			
45	32.12	18.15	6.67			
60	23.94	12.25	4.28			
90	17.34	6.43	3.82			
120	14.43	4.59	3.80			
180	10.58	3.19	3.34			
240	7.17	2.73	2.86			
360	3.86	2.73	2.86			

Tabla VI.48- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti a diferentes velocidades de agitación en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C con 0.5 g de Lewatit y Amberlite y 0.25 g de ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M.

	Conversión (%)					
Tiempo (min)		Lewatit			Amberlite	
	150 rpm	250 rpm	350 rpm	150 rpm	250 rpm	350 rpm
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	39.84	42.30	48.56	45.62	63.17	64.68
30	63.23	75.33	80.84	58.14	83.32	87.52
45	74.88	88.22	92.62	68.26	91.36	94.81
60	81.86	92.86	95.93	76.24	94.42	96.71
90	90.85	96.26	96.72	85.96	96.64	98.13
120	93.99	96.98	97.42	91.09	97.02	98.12
180	95.43	97.38	97.71	94.60	97.40	98.15
240	97.00	97.37	97.80	96.40	97.37	98.51
360	97.72	97.79	97.79	97.14	97.79	98.51

	Conversión (%)					
Tiempo (min)		ECR 1090 M]	ECR 8806 M	I
	150 rpm	250 rpm	350 rpm	150 rpm	250 rpm	350 rpm
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	46.56	63.63	56.40	41.92	60.05	62.49
30	61.89	80.58	83.91	58.20	82.75	86.82
45	74.17	92.82	92.92	68.04	91.28	93.90
60	82.68	95.47	95.33	76.11	94.47	95.70
90	90.63	96.95	96.50	87.12	96.42	97.08
120	93.66	97.34	97.28	91.83	97.26	97.49
180	95.63	97.38	97.67	95.31	97.65	97.46
240	96.34	97.72	97.64	96.50	97.63	97.81
360	96.70	98.11	98.03	97.26	97.63	97.84

		Conversión (%)				
Tiempo (min)	ECR 8285 M					
-	150 rpm	250 rpm	350 rpm			
0	0.00	0.00	0.00			
15	48.28	55.07	65.59			
30	66.02	76.73	88.57			
45	74.23	85.58	94.63			
60	80.80	90.27	96.55			
90	86.09	94.89	96.93			
120	88.42	96.35	96.94			
180	91.51	97.46	97.32			
240	94.25	97.83	97.70			
360	96.90	97.83	97.70			

Tabla VI.48- Continuación.

Comparación de la actividad de los derivados inmovilizados.

Tabla VI.49- Número ácido de las muestras tomadas durante la síntesis de espermaceti con Novozym[®] 435, Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C, 350 rpm, con 50 mg de lipasa en el medio de reacción.

Tiomno	N.A. (mg KOH/g)					
(min)	Novozym [®] 435	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
0	127.54	121.29	122.60	129.54	122.55	123.22
15	70.44	53.69	51.07	31.81	21.04	26.77
30	44.85	14.73	17.99	10.14	8.36	9.81
45	24.86	6.48	7.87	5.64	4.46	5.15
60	12.92	4.13	4.99	4.66	3.42	3.74
90	6.44	3.18	4.11	3.75	3.47	3.27
120	4.78	2.73	3.25	3.28	3.47	2.80
180	3.89	2.78	3.21	3.24	2.95	2.81
240	3.02	2.75	2.78	3.26	2.93	2.80
360	2.62	2.71	2.76	2.81	2.47	2.80

Tiompo	Conversión (%)					
(min)	Novozym [®] 435	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	44.77	55.73	58.35	75.44	82.83	78.27
30	64.84	87.86	85.32	92.18	93.18	92.04
45	80.51	94.66	93.58	95.64	96.36	95.82
60	89.87	96.60	95.93	96.40	97.21	96.96
90	94.95	97.38	96.65	97.10	97.17	97.35
120	96.25	97.75	97.35	97.47	97.17	97.73
180	96.95	97.71	97.38	97.50	97.59	97.72
240	97.63	97.73	97.73	97.48	97.61	97.73
360	97.95	97.77	97.74	97.83	97.98	97.73

Tabla VI.50- Conversión alcanzada durante la síntesis de espermaceti con Novozym[®] 435, Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M y ECR 8285 M en un reactor de altas prestaciones, a 70 °C, 350 rpm, con 50 mg de lipasa en el medio de reacción.

Anexo VII

Ajuste del modelo cinético de pseudo-primer orden a la síntesis de los ésteres cetílicos por separado.

Determinación de la constante cinética global, k_r: CalB immo Plus.

Tabla VII.1- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0190	0.0158		0.9990
0.25	0.0404	0.	0095	0.9996
0.5	0.0826	0.	0115	0.9993
1	0.1309	0.	0129	0.9991
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2234	0.4619	0.7208	0.8675
30	0.4138	0.6884	0.9087	0.9558
45	0.5725	0.8381	0.9581	0.9834
60	0.6838	0.9244	0.9768	0.9870
90	0.8453	0.9724	0.9906	0.9901
120	0.9177	0.9812	0.9906	0.9906
180	0.9698	0.9902	0.9900	0.9901
240	0.9843	0.9902	0.9904	0.9900
360	0.9907	0.9907	0.9905	0.9900
Tiomno (min) —		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2485	0.4542	0.7104	0.8596
30	0.4352	0.7021	0.9161	0.9803
45	0.5755	0.8374	0.9757	0.9972
60	0.6810	0.9113	0.9930	0.9996
90	0.8198	0.9736	0.9994	1.0000
120	0.8982	0.9921	1.0000	1.0000
180	0.9675	0.9993	1.0000	1.0000
240	0.9896	0.9999	1.0000	1.0000
360	0.9989	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0206	0.	0197	0.9984
0.25	0.0391	0.	0148	0.9990
0.5	0.0781	0.	0119	0.9993
1	0.1240	0.	0162	0.9986
T :		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2399	0.4682	0.6983	0.8552
30	0.4262	0.6641	0.8996	0.9460
45	0.6114	0.8331	0.9569	0.9774
60	0.7119	0.9084	0.9775	0.9868
90	0.8726	0.9667	0.9870	0.9871
120	0.9378	0.9802	0.9869	0.9868
180	0.9740	0.9869	0.9870	0.9872
240	0.9842	0.9866	0.9867	0.9868
360	0.9874	0.9868	0.9869	0.9873
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2653	0.4437	0.6900	0.8443
30	0.4602	0.6905	0.9039	0.9758
45	0.6034	0.8278	0.9702	0.9962
60	0.7086	0.9042	0.9908	0.9994
90	0.8427	0.9704	0.9991	1.0000
120	0.9151	0.9908	0.9999	1.0000
180	0.9753	0.9991	1.0000	1.0000
240	0.9928	0.99999	1.0000	1.0000
360	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.2- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error e	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0197	0.	.0130	0.9993
0.25	0.0355	0.	.0139	0.9991
0.5	0.0696	0.	.0158	0.9987
1	0.1060	0.	.0190	0.9981
Tiomno (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2659	0.4130	0.6617	0.8124
30	0.4492	0.6331	0.8625	0.9264
45	0.5663	0.8168	0.9532	0.9709
60	0.6890	0.8929	0.9730	0.9834
90	0.8526	0.9592	0.9802	0.9836
120	0.9103	0.9743	0.9800	0.9838
180	0.9663	0.9853	0.9836	0.9835
240	0.9778	0.9853	0.9802	0.9839
360	0.9851	0.9852	0.9808	0.9840
Tiompo (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2560	0.4130	0.6481	0.7962
30	0.4464	0.6555	0.8762	0.9585
45	0.5881	0.7978	0.9564	0.9915
60	0.6935	0.8813	0.9847	0.9983
90	0.8304	0.9591	0.9981	0.9999
120	0.9061	0.9859	0.9998	1.0000
180	0.9712	0.9983	1.0000	1.0000
240	0.9912	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9992	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.3- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0171	0.0236		0.9978
0.25	0.0353	0.	0102	0.9995
0.5	0.0680	0.	0257	0.9965
1	0.1116	0.	0237	0.9970
Tiomno (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1884	0.4137	0.6635	0.8315
30	0.3664	0.6548	0.8679	0.9250
45	0.5277	0.7984	0.9134	0.9604
60	0.6520	0.8799	0.9528	0.9766
90	0.8126	0.9473	0.9684	0.9803
120	0.9026	0.9759	0.9720	0.9803
180	0.9568	0.9841	0.9759	0.9842
240	0.9722	0.9838	0.9801	0.9845
360	0.9802	0.9839	0.9839	0.9842
Tiomno (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2259	0.4111	0.6395	0.8124
30	0.4008	0.6533	0.8700	0.9648
45	0.5362	0.7958	0.9532	0.9934
60	0.6409	0.8798	0.9831	0.9988
90	0.7849	0.9583	0.9978	1.0000
120	0.8711	0.9855	0.9997	1.0000
180	0.9537	0.9983	1.0000	1.0000
240	0.9834	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9979	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.4- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de CalB immo Plus en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: Novozym[®] 435.

Tabla VII.5- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0187	0.0207		0.9982
0.25	0.0426	0.	0120	0.9993
0.5	0.0874	0.	0164	0.9986
1	0.1349	0.	0168	0.9985
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2196	0.4640	0.7431	0.8751
30	0.3863	0.7225	0.9170	0.9598
45	0.5950	0.8646	0.9564	0.9750
60	0.6837	0.9268	0.9744	0.9804
90	0.8276	0.9687	0.9815	0.9832
120	0.9045	0.9769 0.9815		0.9858
180	0.9637	0.9825 0.9855		0.9859
240	0.9819	0.9857	0.9892	0.9857
360	0.9821	0.9861	0.9865	0.9859
Tiomno (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2445	0.4725	0.7305	0.8677
30	0.4293	0.7218	0.9274	0.9825
45	0.5688	0.8533	0.9804	0.9977
60	0.6742	0.9226	0.9947	0.9997
90	0.8141	0.9785	0.9996	1.0000
120	0.8939	0.9940	1.0000	1.0000
180	0.9654	0.9995	1.0000	1.0000
240	0.9887	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9988	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0185	0.	0243	0.9976
0.25	0.0353	0.	0123	0.9993
0.5	0.0829	0.	0178	0.9983
1	0.1343	0.	0192	0.9981
Tiomno (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2419	0.3973	0.7253	0.8756
30	0.3827	0.6511	0.9067	0.9546
45	0.5426	0.8082	0.9559	0.9703
60	0.6739	0.8904	0.9680	0.9773
90	0.8468	0.9571	0.9794	0.9818
120	0.9246	0.9732	0.9808	0.9822
180	0.9702	0.9810	0.9814	0.9859
240	0.9742	0.9843	0.9855	0.9860
360	0.9808	0.9855	0.9855	0.9865
Tiompo (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2418	0.4115	0.7117	0.8665
30	0.4251	0.6537	0.9169	0.9822
45	0.5641	0.7962	0.9760	0.9976
60	0.6695	0.8801	0.9931	0.9997
90	0.8100	0.9585	0.9994	1.0000
120	0.8908	0.9856	1.0000	1.0000
180	0.9639	0.9983	1.0000	1.0000
240	0.9881	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9987	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.6- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0197	0.0111		0.9995
0.25	0.0418	0.	0131	0.9992
0.5	0.0893	0.	0151	0.9989
1	0.1340	0.	0183	0.9982
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2582	0.4798	0.7495	0.8744
30	0.4317	0.7017	0.9177	0.9559
45	0.6041	0.8523	0.9688	0.9762
60	0.6864	0.9191	0.9745	0.9812
90	0.8306	0.9642	0.9833	0.9816
120	0.9143	0.9762	0.9837	0.9808
180	0.9635	0.9832	0.9871	0.9808
240	0.9767	0.9833	0.9843	0.9846
360	0.9837	0.9871	0.9869	0.9872
Tiomno (min) —		x cal	culada	
Tiempo (iiiii)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2557	0.4656	0.7380	0.8661
30	0.4460	0.7144	0.9314	0.9821
45	0.5877	0.8474	0.9820	0.9976
60	0.6931	0.9184	0.9953	0.9997
90	0.8300	0.9767	0.9997	1.0000
120	0.9058	0.9933	1.0000	1.0000
180	0.9711	0.9995	1.0000	1.0000
240	0.9911	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9992	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.7- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0150	0.0400		0.9940
0.25	0.0352	0.	0226	0.9977
0.5	0.0859	0.	0306	0.9950
1	0.1249	0.	0229	0.9972
Tionera (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1082	0.3731	0.7633	0.8582
30	0.3280	0.6537	0.8704	0.9456
45	0.4758	0.8124	0.9498	0.9667
60	0.6083	0.9027	0.9665	0.9777
90	0.7867	0.9612	0.9701	0.9817
120	0.8689	0.9726 0.9786		0.9814
180	0.9529	0.9807	0.9787	0.9699
240	0.9606	0.9611	0.9786	0.9779
360	0.9803	0.9805	0.9872	0.9851
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2020	0.4103	0.7243	0.8463
30	0.3632	0.6523	0.9240	0.9764
45	0.4919	0.7950	0.9790	0.9964
60	0.5945	0.8791	0.9942	0.9994
90	0.7418	0.9580	0.9996	1.0000
120	0.8356	0.9854	1.0000	1.0000
180	0.9333	0.9982	1.0000	1.0000
240	0.9730	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9956	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.8- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Novozym[®] 435 en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lipozyme[®] RM IM.

Tabla VII.9- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0179	0.	0327	0.9959
0.25	0.0329	0.	0158	0.9989
0.5	0.0620	0.	0134	0.9991
1	0.1163	0.	0180	0.9983
Tionero (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1972	0.3763	0.6011	0.8358
30	0.3688	0.6130	0.8519	0.9475
45	0.5265	0.7833	0.9423	0.9687
60	0.6700	0.8803	0.9659	0.9816
90	0.8441	0.9599	0.9789	0.9816
120	0.9357	0.9709 0.9815		0.9812
180	0.9748	0.9738 0.9819		0.9844
240	0.9809	0.9808	0.9844	0.9846
360	0.9843	0.9844	0.9847	0.9875
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (inin) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2357	0.3897	0.6053	0.8253
30	0.4159	0.6275	0.8442	0.9695
45	0.5536	0.7727	0.9385	0.9947
60	0.6588	0.8613	0.9757	0.9991
90	0.8007	0.9483	0.9962	1.0000
120	0.8836	0.9808	0.9994	1.0000
180	0.9603	0.9973	1.0000	1.0000
240	0.9865	0.9996	1.0000	1.0000
360	0.9984	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0165	0.	0381	0.9945
0.25	0.0356	0.	0201	0.9982
0.5	0.0605	0.	0174	0.9985
1	0.1015	0.	0197	0.9979
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1732	0.3796	0.5807	0.7956
30	0.3211	0.6496	0.8561	0.9314
45	0.5001	0.8194	0.9431	0.9662
60	0.6595	0.9098	0.9662	0.9730
90	0.8102	0.9623	0.9765	0.9799
120	0.9142	0.9754 0.9761		0.9794
180	0.9624	0.9790	0.9800	0.9801
240	0.9746	0.9792	0.9799	0.9832
360	0.9808	0.9825	0.9831	0.9862
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2196	0.4138	0.5966	0.7820
30	0.3909	0.6564	0.8373	0.9525
45	0.5247	0.7986	0.9344	0.9896
60	0.6291	0.8820	0.9735	0.9977
90	0.7741	0.9594	0.9957	0.9999
120	0.8624	0.9861	0.9993	1.0000
180	0.9490	0.9984	1.0000	1.0000
240	0.9811	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9974	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.10- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0163	0.0283		0.9969
0.25	0.0353	0.	0187	0.9984
0.5	0.0659	0.	0153	0.9988
1	0.1074	0.	0237	0.9970
T ioner o (i n)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1873	0.3838	0.6216	0.8145
30	0.3409	0.6631	0.8759	0.9364
45	0.5090	0.7905	0.9472	0.9598
60	0.6181	0.9100	0.9671	0.9718
90	0.8061	0.9627	0.9758	0.9726
120	0.9028	0.9692 0.9795		0.9763
180	0.9637	0.9782	0.9839	0.9762
240	0.9724	0.9816	0.9837	0.9801
360	0.9765	0.9815	0.9835	0.9840
Tiompo (min)		x cal	culada	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2172	0.4114	0.6279	0.8002
30	0.3872	0.6536	0.8615	0.9601
45	0.5203	0.7961	0.9485	0.9920
60	0.6245	0.8800	0.9808	0.9984
90	0.7699	0.9584	0.9973	0.9999
120	0.8590	0.9856	0.9996	1.0000
180	0.9471	0.9983	1.0000	1.0000
240	0.9801	0.9998	1.0000	1.0000
360	0.9972	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.11- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0149	0.	0414	0.9936
0.25	0.0318	0.	0213	0.9980
0.5	0.0543	0.	0190	0.9982
1	0.0996	0.	0330	0.9940
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1299	0.3613	0.5449	0.7930
30	0.3009	0.5865	0.8182	0.9274
45	0.4574	0.7876	0.9225	0.9521
60	0.6056	0.8760	0.9525	0.9578
90	0.7743	0.9476	0.9700	0.9611
120	0.8923	0.9658 0.9743		0.9565
180	0.9525	0.9737	0.9738	0.9661
240	0.9656	0.9740	0.9784	0.9705
360	0.9749	0.9829	0.9783	0.9739
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1998	0.3790	0.5571	0.7755
30	0.3597	0.6144	0.8038	0.9496
45	0.4876	0.7606	0.9131	0.9887
60	0.5900	0.8513	0.9615	0.9975
90	0.7374	0.9427	0.9924	0.9999
120	0.8319	0.9779	0.9985	1.0000
180	0.9311	0.9967	0.9999	1.0000
240	0.9717	0.9995	1.0000	1.0000
360	0.9952	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.12- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] RM IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lipozyme[®] TL IM.

Tabla VII.13- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error estándar (S)		Coeficiente de correlación (r)	
0.125	0.0028	0.0028		0	.9954
0.25	0.0069	0.0069		0	.9914
0.5	0.0161		0.0433	0	.9931
1	0.0357		0.0338	0	.9951
2	0.0814		0.0177	0	.9983
Tiomro (min)			x experimental		
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0580	0.0729	0.1704	0.3379	0.7151
30	0.0758	0.1612	0.3146	0.6561	0.9094
45	0.1205	0.2297	0.4786	0.8390	0.9555
60	0.1544	0.2934	0.6136	0.9284	0.9691
90	0.2146	0.4260	0.8186	0.9671	0.9765
120	0.2618	0.5408	0.9256	0.9783	0.9768
180	0.3799	0.7515	0.9747	0.9853	0.9827
240	0.4824	0.8907	0.9814	0.9853	0.9834
360	0.6867	0.9742	0.9856	0.9856	0.9863
Tiomno (min) —			x calculada		
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0415	0.0989	0.2142	0.4147	0.7052
30	0.0814	0.1880	0.3825	0.6574	0.9131
45	0.1195	0.2682	0.5148	0.7995	0.9744
60	0.1561	0.3406	0.6187	0.8826	0.9925
90	0.2248	0.4645	0.7646	0.9598	0.9993
120	0.2878	0.5652	0.8546	0.9862	0.9999
180	0.3990	0.7133	0.9446	0.9984	1.0000
240	0.4928	0.8109	0.9789	0.9998	1.0000
360	0.6388	0.9178	0.9969	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)	
0.125	0.0033		0.0266	0	.9942
0.25	0.0075		0.0469	0	.9910
0.5	0.0169		0.0350	0	.9953
1	0.0405		0.0201	0	.9981
2	0.0828		0.0192	0	.9980
			<i>x</i> experimental		
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0353	0.0903	0.1960	0.4161	0.7235
30	0.0608	0.1536	0.3476	0.7097	0.9114
45	0.1246	0.2290	0.4983	0.8602	0.9507
60	0.1691	0.3012	0.6274	0.9372	0.9673
90	0.2465	0.4557	0.8390	0.9700	0.9779
120	0.3066	0.6046	0.9202	0.9784	0.9776
180	0.4441	0.7942	0.9708	0.9820	0.9818
240	0.5418	0.9056	0.9820	0.9852	0.9817
360	0.7607	0.9642	0.9855	0.9855	0.9854
Tiomno (min)			x calculada		
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0488	0.1058	0.2236	0.4554	0.7114
30	0.0952	0.2005	0.3971	0.7035	0.9167
45	0.1393	0.2851	0.5319	0.8385	0.9760
60	0.1813	0.3608	0.6365	0.9121	0.9931
90	0.2593	0.4889	0.7809	0.9739	0.9994
120	0.3298	0.5914	0.8679	0.9923	1.0000
180	0.4513	0.7388	0.9520	0.9993	1.0000
240	0.5508	0.8330	0.9826	0.9999	1.0000
360	0.6989	0.9318	0.9977	1.0000	1.0000

Tabla VII.14- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] TL IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	ndar (S) Coeficiente d correlación (s	
0.125	0.0033		0.0297	().9925
0.25	0.0073		0.0429	().9922
0.5	0.0158		0.0284	().9968
1	0.0380		0.0207	().9980
2	0.0778		0.0208	().9977
			<i>x</i> experimental		
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0415	0.1021	0.1938	0.4049	0.7035
30	0.0841	0.1604	0.3394	0.6736	0.8971
45	0.1192	0.2231	0.4758	0.8453	0.9452
60	0.1577	0.2933	0.6047	0.9198	0.9607
90	0.2300	0.4629	0.7940	0.9667	0.9744
120	0.3007	0.5857	0.8975	0.9744	0.9779
180	0.4310	0.7867	0.9662	0.9745	0.9816
240	0.5256	0.8870	0.9735	0.9747	0.9779
360	0.7653	0.9615	0.9816	0.9821	0.9854
Tiomno (min)			x calculada		
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0476	0.1039	0.2111	0.4347	0.6886
30	0.0930	0.1970	0.3776	0.6805	0.9030
45	0.1362	0.2805	0.5090	0.8194	0.9698
60	0.1773	0.3552	0.6126	0.8979	0.9906
90	0.2538	0.4823	0.7589	0.9674	0.9991
120	0.3232	0.5843	0.8499	0.9896	0.9999
180	0.4432	0.7319	0.9419	0.9989	1.0000
240	0.5419	0.8272	0.9775	0.9999	1.0000
360	0.6900	0.9281	0.9966	1.0000	1.0000

Tabla VII.15- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] *TL IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.*

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
0.125	0.0029		0.0470	0.9809		
0.25	0.0069		0.0424	0.9924		
0.5	0.0158		0.0267	0	.9972	
1	0.0356		0.0285	0.9964		
2	0.0694		0.0196	0.9980		
	<i>x</i> experimental					
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.0386	0.0662	0.1785	0.3519	0.6434	
30	0.0749	0.1438	0.3516	0.6563	0.8926	
45	0.1026	0.2275	0.4760	0.8335	0.9467	
60	0.1358	0.2860	0.6120	0.9158	0.9617	
90	0.1519	0.4374	0.7902	0.9626	0.9702	
120	0.2399	0.5623	0.8939	0.9728	0.9751	
180	0.3963	0.7499	0.9622	0.9806	0.9787	
240	0.5282	0.8788	0.9741	0.9806	0.9791	
360	0.7432	0.9610	0.9814	0.9846	0.9834	
Tiempo (min) —	x calculada					
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.0430	0.0987	0.2112	0.4137	0.6470	
30	0.0842	0.1876	0.3778	0.6562	0.8754	
45	0.1236	0.2677	0.5093	0.7984	0.9560	
60	0.1613	0.3400	0.6129	0.8818	0.9845	
90	0.2319	0.4638	0.7592	0.9594	0.9981	
120	0.2965	0.5644	0.8502	0.9860	0.9998	
180	0.4100	0.7125	0.9420	0.9983	1.0000	
240	0.5051	0.8102	0.9775	0.9998	1.0000	
360	0.6518	0.9173	0.9966	1.0000	1.0000	

Tabla VII.16- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lipozyme[®] *TL IM en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.*

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lewatit.

Tabla VII.17- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)		Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
0.125	0.0088		0.0705	0.9822		
0.25	0.0211		0.0292	C).9966	
0.5	0.0514	0.0514 0.01		0.9991		
1	0.1110	0.1110		0.9987		
2	0.1080		0.0188	0.9981		
T :	x experimental					
Tiempo (min) –	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.0967	0.2590	0.5198	0.8208	0.8152	
30	0.1835	0.4204	0.7907	0.9445	0.9384	
45	0.2436	0.5959	0.9197	0.9732	0.9625	
60	0.3245	0.7246	0.9614	0.9805	0.9756	
90	0.4926	0.9071	0.9785	0.9831	0.9824	
120	0.6888	0.9569	0.9819	0.9858	0.9864	
180	0.9131	0.9783	0.9857	0.9868	0.9858	
240	0.9713	0.9858	0.9855	0.9871	0.9859	
360	0.9822	0.9859	0.9864	0.9870	0.9863	
Tiempo (min) —	x calculada					
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.1233	0.2713	0.5372	0.8107	0.8020	
30	0.2313	0.4690	0.7858	0.9642	0.9608	
45	0.3261	0.6131	0.9009	0.9932	0.9922	
60	0.4092	0.7181	0.9541	0.9987	0.9985	
90	0.5459	0.8503	0.9902	1.0000	0.9999	
120	0.6509	0.9205	0.9979	1.0000	1.0000	
180	0.7937	0.9776	0.9999	1.0000	1.0000	
240	0.8781	0.9937	1.0000	1.0000	1.0000	
360	0.9575	0.9995	1.0000	1.0000	1.0000	

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
0.125	0.0078		0.0681	0.9828		
0.25	0.0217		0.0263	0.9972		
0.5	0.0515		0.0126	0.9992		
1	0.0908		0.0151	0.9988		
2	0.1029	0.1029		0.9972		
	<i>x</i> experimental					
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.0863	0.2371	0.5258	0.7490	0.8069	
30	0.1504	0.4556	0.7943	0.9339	0.9195	
45	0.2194	0.6031	0.9120	0.9658	0.9571	
60	0.3051	0.7557	0.9554	0.9746	0.9747	
90	0.4547	0.8982	0.9752	0.9824	0.9815	
120	0.6021	0.9551	0.9803	0.9832	0.9818	
180	0.8631	0.9774	0.9860	0.9858	0.9845	
240	0.9527	0.9815	0.9866	0.9829	0.9843	
360	0.9783	0.9847	0.9863	0.9862	0.9849	
Tiempo (min) —	x calculada					
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.1108	0.2783	0.5378	0.7438	0.7864	
30	0.2094	0.4791	0.7864	0.9344	0.9544	
45	0.2970	0.6240	0.9013	0.9832	0.9903	
60	0.3749	0.7287	0.9544	0.9957	0.9979	
90	0.5058	0.8587	0.9903	0.9997	0.9999	
120	0.6093	0.9264	0.9979	1.0000	1.0000	
180	0.7558	0.9800	0.9999	1.0000	1.0000	
240	0.8473	0.9946	1.0000	1.0000	1.0000	
360	0.9403	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	

Tabla VII.18- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
0.125	0.0079		0.0655	0.9840		
0.25	0.0229		0.0260	0.9972		
0.5	0.0496		0.0154	0.9988		
1	0.0964		0.0141	0.9990		
2	0.1031		0.0283	0.9957		
	x experimental					
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.0862	0.2534	0.5083	0.7746	0.8149	
30	0.1569	0.4644	0.7755	0.9316	0.9050	
45	0.2238	0.6357	0.9184	0.9678	0.9491	
60	0.3015	0.7746	0.9522	0.9793	0.9722	
90	0.4573	0.9147	0.9762	0.9852	0.9754	
120	0.6227	0.9597	0.9797	0.9858	0.9831	
180	0.8564	0.9776	0.9846	0.9858	0.9823	
240	0.9501	0.9810	0.9843	0.9892	0.9859	
360	0.9773	0.9852	0.9840	0.9895	0.9862	
Tiempo (min) —	x calculada					
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.1117	0.2911	0.5251	0.7643	0.7871	
30	0.2110	0.4975	0.7745	0.9445	0.9547	
45	0.2991	0.6438	0.8929	0.9869	0.9903	
60	0.3774	0.7475	0.9492	0.9969	0.9979	
90	0.5088	0.8731	0.9885	0.9998	0.9999	
120	0.6124	0.9362	0.9974	1.0000	1.0000	
180	0.7587	0.9839	0.9999	1.0000	1.0000	
240	0.8498	0.9959	1.0000	1.0000	1.0000	
360	0.9418	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	

Tabla VII.19- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.
Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$		Error estándar (S)	Coef corre	iciente de elación (r)	
0.125	0.0089	0.0503		0	0.9904	
0.25	0.0203		0.0280	0	.9969	
0.5	0.0457		0.0192	0	0.9982	
1	0.0855		0.0202	0).9978	
2	0.0993		0.0278	0	.9958	
			<i>x</i> experimental			
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.1070	0.2269	0.4721	0.7413	0.8009	
30	0.1761	0.4170	0.7466	0.9007	0.9076	
45	0.2760	0.5871	0.9015	0.9628	0.9486	
60	0.3652	0.7186	0.9477	0.9688	0.9644	
90	0.5214	0.8901	0.9713	0.9766	0.9727	
120	0.6758	0.9431	0.9758	0.9799	0.9804	
180	0.8832	0.9757	0.9806	0.9801	0.9842	
240	0.9533	0.9803	0.9798	0.9809	0.9849	
360	0.9752	0.9842	0.9803	0.9840	0.9839	
Tiomno (min) —			x calculada			
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
15	0.1250	0.2629	0.4965	0.7228	0.7744	
30	0.2344	0.4567	0.7465	0.9231	0.9491	
45	0.3301	0.5995	0.8724	0.9787	0.9885	
60	0.4138	0.7048	0.9357	0.9941	0.9974	
90	0.5512	0.8396	0.9837	0.9995	0.9999	
120	0.6564	0.9129	0.9959	1.0000	1.0000	
180	0.7986	0.9743	0.9997	1.0000	1.0000	
240	0.8819	0.9924	1.0000	1.0000	1.0000	
360	0.9594	0.9993	1.0000	1.0000	1.0000	

Tabla VII.20- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Lewatit en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: Amberlite.

Tabla VII.21- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0170	0.0417		0.9935
0.25	0.0372	0.	0169	0.9987
0.5	0.0706	0.	0162	0.9987
1	0.1233	0.	0182	0.9982
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1349	0.4070	0.6436	0.8513
30	0.3494	0.6588	0.9003	0.9548
45	0.5411	0.8332	0.9538	0.9719
60	0.6435	0.9167	0.9722	0.9794
90	0.8287	0.9663	0.9790	0.9826
120	0.9199	0.9761	0.9820	0.9828
180	0.9647	0.9832	0.9821	0.9827
240	0.9755	0.9829	0.9822	0.9828
360	0.9829	0.9832	0.9820	0.9825
Tiomno (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2250	0.4277	0.6533	0.8427
30	0.3994	0.6725	0.8798	0.9752
45	0.5345	0.8125	0.9583	0.9961
60	0.6393	0.8927	0.9856	0.9994
90	0.7833	0.9649	0.9983	1.0000
120	0.8699	0.9885	0.9998	1.0000
180	0.9531	0.9988	1.0000	1.0000
240	0.9831	0.99999	1.0000	1.0000
360	0.9978	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0166	0.0278		0.9969
0.25	0.0320	0.	0292	0.9963
0.5	0.0663	0.	0153	0.9988
1	0.1216	0.	0201	0.9978
T :		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1961	0.3100	0.6229	0.8490
30	0.3445	0.6340	0.8772	0.9494
45	0.5111	0.7757	0.9482	0.9709
60	0.6245	0.8863	0.9703	0.9744
90	0.8113	0.9552	0.9777	0.9817
120	0.9070	0.9742	0.9817	0.9814
180	0.9637	0.9813	0.9818	0.9816
240	0.9712	0.9812	0.9814	0.9817
360	0.9786	0.9813	0.9816	0.9814
Tiompo (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2199	0.3810	0.6298	0.8386
30	0.3914	0.6169	0.8630	0.9739
45	0.5252	0.7629	0.9493	0.9958
60	0.6296	0.8532	0.9812	0.9993
90	0.7746	0.9438	0.9974	1.0000
120	0.8628	0.9785	0.9996	1.0000
180	0.9492	0.9968	1.0000	1.0000
240	0.9812	0.9995	1.0000	1.0000
360	0.9974	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.22- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error e	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0163	0.0240		0.9977
0.25	0.0308	0.	.0203	0.9982
0.5	0.0639	0.	.0165	0.9986
1	0.1090	0.	.0276	0.9959
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2123	0.3401	0.6124	0.8210
30	0.3683	0.5836	0.8625	0.9367
45	0.4755	0.7642	0.9454	0.9504
60	0.6236	0.8757	0.9651	0.9615
90	0.7945	0.9478	0.9718	0.9772
120	0.9013	0.9720	0.9801	0.9735
180	0.9583	0.9799	0.9802	0.9775
240	0.9738	0.9803	0.9805	0.9769
360	0.9813	0.9803	0.9802	0.9768
Tiompo (min)		x cal	culada	
Tiempo (inin)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2167	0.3699	0.6163	0.8051
30	0.3864	0.6029	0.8528	0.9620
45	0.5194	0.7498	0.9435	0.9926
60	0.6235	0.8424	0.9783	0.9986
90	0.7690	0.9374	0.9968	0.9999
120	0.8583	0.9751	0.9995	1.0000
180	0.9466	0.9961	1.0000	1.0000
240	0.9799	0.9994	1.0000	1.0000
360	0.9972	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.23- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0149	0.0347		0.9952
0.25	0.0285	0.	0317	0.9957
0.5	0.0621	0.	0180	0.9983
1	0.0962	0.	0231	0.9971
T :		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1654	0.2743	0.6092	0.7813
30	0.3194	0.5826	0.8509	0.9210
45	0.4574	0.7368	0.9352	0.9580
60	0.5828	0.8595	0.9579	0.9700
90	0.7763	0.9380	0.9728	0.9776
120	0.8878	0.9531	0.9769	0.9809
180	0.9545	0.9772	0.9767	0.9772
240	0.9555	0.9769	0.9769	0.9774
360	0.9551	0.9770	0.9804	0.9777
Tiompo (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2002	0.3482	0.6062	0.7639
30	0.3603	0.5751	0.8449	0.9443
45	0.4883	0.7230	0.9389	0.9868
60	0.5908	0.8195	0.9759	0.9969
90	0.7382	0.9233	0.9963	0.9998
120	0.8325	0.9674	0.9994	1.0000
180	0.9315	0.9941	1.0000	1.0000
240	0.9720	0.9989	1.0000	1.0000
360	0.9953	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.24- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de Amberlite en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 1090 M.

Tabla VII.25- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0208	0.0660		0.9843
0.25	0.0587	0.	0166	0.9986
0.5	0.1044	0.	0187	0.9981
1	0.1184	0.	0235	0.9970
Tionero (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1891	0.5688	0.8017	0.8463
30	0.3434	0.8441	0.9413	0.9343
45	0.5905	0.9440	0.9654	0.9653
60	0.7948	0.9628	0.9757	0.9724
90	0.9398	0.9733	0.9792	0.9792
120	0.9648	0.9801	0.9792	0.9794
180	0.9787	0.9833	0.9827	0.9826
240	0.9826	0.9834	0.9827	0.9826
360	0.9824	0.9835	0.9862	0.9828
Tiomno (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2684	0.5856	0.7912	0.8306
30	0.4648	0.8283	0.9564	0.9713
45	0.6084	0.9288	0.9909	0.9951
60	0.7135	0.9705	0.9981	0.9992
90	0.8467	0.9949	0.9999	1.0000
120	0.9179	0.9991	1.0000	1.0000
180	0.9765	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9933	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0227	0.0513		0.9899
0.25	0.0669	0.	0182	0.9983
0.5	0.1004	0.	0190	0.9981
1	0.1099	0.	0228	0.9972
Tiomno (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2280	0.6513	0.7894	0.8248
30	0.3936	0.8550	0.9350	0.9296
45	0.6604	0.9383	0.9679	0.9613
60	0.8043	0.9630	0.9747	0.9751
90	0.9372	0.9742	0.9784	0.9788
120	0.9634	0.9778	0.9783	0.9823
180	0.9743	0.9816	0.9820	0.9823
240	0.9814	0.9816	0.9819	0.9823
360	0.9816	0.9817	0.9819	0.9822
Tiompo (min) —		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2891	0.6335	0.7781	0.8077
30	0.4946	0.8657	0.9508	0.9630
45	0.6407	0.9508	0.9891	0.9929
60	0.7446	0.9820	0.9976	0.9986
90	0.8709	0.9976	0.9999	0.9999
120	0.9348	0.9997	1.0000	1.0000
180	0.9833	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9957	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.26- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error e	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0291	0.0329		0.9954
0.25	0.0632	0.	.0173	0.9985
0.5	0.1003	0.	.0233	0.9971
1	0.1111	0.	.0242	0.9969
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2703	0.6205	0.7937	0.8308
30	0.5931	0.8546	0.9296	0.9224
45	0.7525	0.9320	0.9543	0.9630
60	0.8557	0.9531	0.9683	0.9731
90	0.9453	0.9746	0.9753	0.9796
120	0.9670	0.9785	0.9788	0.9830
180	0.9782	0.9820	0.9790	0.9828
240	0.9818	0.9819	0.9823	0.9830
360	0.9817	0.9819	0.9825	0.9831
Tiompo (min)		<i>x</i> cal	culada	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3538	0.6126	0.7778	0.8110
30	0.5824	0.8499	0.9506	0.9643
45	0.7302	0.9419	0.9890	0.9933
60	0.8256	0.9775	0.9976	0.9987
90	0.9272	0.9966	0.9999	1.0000
120	0.9696	0.9995	1.0000	1.0000
180	0.9947	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9991	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.27- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0282	0.0329		0.9954
0.25	0.0569	0.	0213	0.9977
0.5	0.0892	0.	0287	0.9955
1	0.1023	0.	0331	0.9940
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2650	0.5844	0.7588	0.8097
30	0.5765	0.8219	0.9090	0.9139
45	0.7402	0.9187	0.9499	0.9448
60	0.8531	0.9436	0.9598	0.9554
90	0.9331	0.9611	0.9629	0.9654
120	0.9545	0.9682	0.9694	0.9690
180	0.9718	0.9756	0.9763	0.9724
240	0.9788	0.9788	0.9796	0.9758
360	0.9822	0.9824	0.9693	0.9827
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3446	0.5742	0.7376	0.7845
30	0.5704	0.8187	0.9312	0.9536
45	0.7184	0.9228	0.9819	0.9900
60	0.8154	0.9671	0.9953	0.9978
90	0.9207	0.9940	0.9997	0.9999
120	0.9659	0.9989	1.0000	1.0000
180	0.9937	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9988	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.28- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 1090 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 8806 M.

Tabla VII.29- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0282	0.0242		0.9974
0.25	0.0680	0.	0212	0.9976
0.5	0.1064	0.	0256	0.9965
1	0.1183	0.	0271	0.9960
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3153	0.6541	0.8150	0.8453
30	0.5390	0.8650	0.9268	0.9380
45	0.7364	0.9393	0.9631	0.9626
60	0.8496	0.9597	0.9698	0.9626
90	0.9400	0.9693	0.9731	0.9700
120	0.9641	0.9730	0.9732	0.9759
180	0.9734	0.9764	0.9766	0.9761
240	0.9736	0.9763	0.9765	0.9794
360	0.9770	0.9798	0.9799	0.9794
Tiompo (min)		x cale	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3448	0.6394	0.7974	0.8305
30	0.5707	0.8700	0.9589	0.9713
45	0.7187	0.9531	0.9917	0.9951
60	0.8157	0.9831	0.9983	0.9992
90	0.9209	0.9978	0.9999	1.0000
120	0.9660	0.9997	1.0000	1.0000
180	0.9937	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9988	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0308	0.0194		0.9983
0.25	0.0637	0.	0184	0.9983
0.5	0.1109	0.	0229	0.9972
1	0.1206	0.	0228	0.9972
Tiomno (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3420	0.6151	0.8243	0.8481
30	0.5954	0.8629	0.9390	0.9455
45	0.7601	0.9371	0.9613	0.9656
60	0.8698	0.9594	0.9693	0.9730
90	0.9461	0.9702	0.9768	0.9768
120	0.9659	0.9740	0.9810	0.9766
180	0.9731	0.9777	0.9809	0.9810
240	0.9773	0.9815	0.9807	0.9808
360	0.9771	0.9815	0.9807	0.9810
Tiomno (min) —		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3703	0.6151	0.8105	0.8362
30	0.6035	0.8519	0.9641	0.9732
45	0.7504	0.9430	0.9932	0.9956
60	0.8428	0.9781	0.9987	0.9993
90	0.9377	0.9967	1.0000	1.0000
120	0.9753	0.9995	1.0000	1.0000
180	0.9961	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.30- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error e	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0285	0.0201		0.9982
0.25	0.0616	0.	0192	0.9981
0.5	0.1045	0.	0238	0.9970
1	0.1273	0.	0228	0.9970
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3221	0.6060	0.8049	0.8629
30	0.5587	0.8470	0.9366	0.9485
45	0.7328	0.9356	0.9624	0.9674
60	0.8488	0.9579	0.9661	0.9710
90	0.9319	0.9730	0.9740	0.9779
120	0.9598	0.9734	0.9777	0.9780
180	0.9721	0.9732	0.9776	0.9779
240	0.9758	0.9773	0.9778	0.9779
360	0.9757	0.9770	0.9775	0.9780
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3478	0.6029	0.7916	0.8518
30	0.5746	0.8423	0.9566	0.9780
45	0.7225	0.9374	0.9909	0.9967
60	0.8190	0.9751	0.9981	0.9995
90	0.9230	0.9961	0.9999	1.0000
120	0.9673	0.9994	1.0000	1.0000
180	0.9941	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9989	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.31- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0290	0.	0178	0.9986
0.25	0.0626	0.	0211	0.9977
0.5	0.0957	0.	0267	0.9961
1	0.1155	0.	0296	0.9952
Tianna (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3355	0.6143	0.7800	0.8432
30	0.5801	0.8546	0.9219	0.9250
45	0.7244	0.9306	0.9520	0.9543
60	0.8468	0.9569	0.9649	0.9669
90	0.9364	0.9695	0.9696	0.9750
120	0.9618	0.9739	0.9738	0.9749
180	0.9698	0.9737	0.9742	0.9751
240	0.9742	0.9739	0.9740	0.9749
360	0.9742	0.9737	0.9785	0.9790
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3529	0.6091	0.7620	0.8231
30	0.5813	0.8472	0.9434	0.9687
45	0.7291	0.9403	0.9865	0.9945
60	0.8247	0.9767	0.9968	0.9990
90	0.9266	0.9964	0.9998	1.0000
120	0.9693	0.9995	1.0000	1.0000
180	0.9946	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9991	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.32- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8806 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 8285 M.

Tabla VII.33- Ajuste del modelo a la síntesis de laurato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0106	0.	0999	0.9670
0.25	0.0590	0.	0268	0.9963
0.5	0.1144	0.	0314	0.9946
1	0.1198	0.	0376	0.9922
T :		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1351	0.5588	0.8404	0.8579
30	0.2063	0.8671	0.9245	0.9150
45	0.2753	0.9392	0.9548	0.9503
60	0.3368	0.9542	0.9623	0.9574
90	0.5603	0.9655	0.9699	0.9681
120	0.9109	0.9695	0.9736	0.9680
180	0.9720	0.9732	0.9736	0.9682
240	0.9715	0.9732	0.9737	0.9682
360	0.9825	0.9733	0.9736	0.9681
Tiomno (min)		x cal	culada	
	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1470	0.5872	0.8202	0.8342
30	0.2723	0.8296	0.9677	0.9725
45	0.3793	0.9297	0.9942	0.9954
60	0.4705	0.9710	0.9990	0.9992
90	0.6147	0.9951	1.0000	1.0000
120	0.7197	0.9992	1.0000	1.0000
180	0.8516	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9214	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9780	1.0000	1.0000	1.0000

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0198	0.	0600	0.9867
0.25	0.0704	0.	0244	0.9968
0.5	0.1085	0.	0329	0.9940
1	0.1203	0.	0386	0.9918
Tioner o (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (min) —	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2143	0.6606	0.8261	0.8609
30	0.3581	0.8812	0.9189	0.9110
45	0.5284	0.9448	0.9521	0.9443
60	0.7527	0.9594	0.9632	0.9591
90	0.9343	0.9668	0.9668	0.9666
120	0.9636	0.9706	0.9705	0.9703
180	0.9671	0.9706	0.9705	0.9703
240	0.9707	0.9705	0.9705	0.9703
360	0.9709	0.9705	0.9705	0.9703
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2574	0.6519	0.8036	0.8355
30	0.4486	0.8788	0.9614	0.9729
45	0.5905	0.9578	0.9924	0.9956
60	0.6959	0.9853	0.9985	0.9993
90	0.8323	0.9982	0.9999	1.0000
120	0.9075	0.9998	1.0000	1.0000
180	0.9719	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9915	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9992	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.34- Ajuste del modelo a la síntesis de miristato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	k _r (min ⁻¹)	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0171	0.	0698	0.9827
0.25	0.0554	0.	0263	0.9965
0.5	0.1093	0.	0342	0.9936
1	0.1204	0.	0395	0.9914
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.1734	0.5321	0.8329	0.8636
30	0.2933	0.8411	0.9074	0.9053
45	0.4573	0.9362	0.9518	0.9346
60	0.6644	0.9587	0.9630	0.9564
90	0.9069	0.9662	0.9667	0.9673
120	0.9552	0.9700	0.9704	0.9745
180	0.9664	0.9700	0.9741	0.9782
240	0.9739	0.9737	0.9741	0.9782
360	0.9738	0.9737	0.9778	0.9782
Tiomno (min) —		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2261	0.5645	0.8058	0.8356
30	0.4010	0.8104	0.9623	0.9730
45	0.5365	0.9174	0.9927	0.9956
60	0.6412	0.9640	0.9986	0.9993
90	0.7851	0.9932	0.9999	1.0000
120	0.8713	0.9987	1.0000	1.0000
180	0.9538	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9834	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9979	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.35- Ajuste del modelo a la síntesis de palmitato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Masa de biocatalizador (g)	$k_r (min^{-1})$	Error es	stándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
0.125	0.0246	0.	0619	0.9853
0.25	0.0582	0.	0210	0.9977
0.5	0.0981	0.	0325	0.9942
1	0.1147	0.	0403	0.9910
Tiompo (min)		<i>x</i> expe	rimental	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2000	0.5751	0.7997	0.8496
30	0.4350	0.8426	0.9020	0.9074
45	0.7084	0.9258	0.9454	0.9356
60	0.8631	0.9555	0.9600	0.9517
90	0.9453	0.9703	0.9710	0.9638
120	0.9636	0.9704	0.9745	0.9718
180	0.9672	0.9740	0.9746	0.9718
240	0.9709	0.9740	0.9745	0.9718
360	0.9708	0.9740	0.9746	0.9718
Tiomno (min)		x cal	culada	
Tiempo (mm)	0.125 g	0.25 g	0.5 g	1 g
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3090	0.5822	0.7703	0.8210
30	0.5225	0.8255	0.9472	0.9680
45	0.6700	0.9271	0.9879	0.9943
60	0.7720	0.9695	0.9972	0.9990
90	0.8911	0.9947	0.9999	1.0000
120	0.9480	0.9991	1.0000	1.0000
180	0.9881	1.0000	1.0000	1.0000
240	0.9973	1.0000	1.0000	1.0000
360	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000

Tabla VII.36- Ajuste del modelo a la síntesis de estearato de cetilo utilizando diferentes cantidades de ECR 8285 M en el reactor de altas prestaciones a 70 °C y 350 rpm.

Anexo VIII

Ajuste del modelo cinético de pseudo-primer orden a la síntesis de espermaceti.

Determinación de la constante cinética global, k_r: CalB immo Plus.

Tabla VIII.1- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de CalB immo Plus.

Temperatura (°C)	$k_r (min^{-1})$	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0583	0.0133	0.9991
70	0.0744	0.0154	0.9988
80	0.0901	0.0164	0.9986
Tiomno (min)		x experimental	
	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5870	0.6862	0.7549
30	0.8322	0.8822	0.9142
45	0.9205	0.9508	0.9687
60	0.9560	0.9725	0.9794
90	0.9752	0.9825	0.9825
120	0.9819	0.9825	0.9823
180	0.9855	0.9824	0.9792
240	0.9857	0.9827	0.9859
360	0.9856	0.9862	0.9861
Tionne (min)		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5828	0.6722	0.7411
30	0.8260	0.8925	0.9330
45	0.9274	0.9648	0.9827
60	0.9697	0.9885	0.9955
90	0.9947	0.9988	0.9997
120	0.9991	0.9999	1.0000
180	1.0000	1.0000	1.0000
240	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: Novozym[®] 435.

Tabla VIII.2- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Novozym[®] 435.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0617	0.0180	0.9983
70	0.0768	0.0175	0.9984
80	0.1024	0.0199	0.9979
Tiompo (min)		x experimental	
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.6203	0.6871	0.7932
30	0.8342	0.9042	0.9434
45	0.9294	0.9603	0.9681
60	0.9556	0.9714	0.9719
90	0.9780	0.9715	0.9760
120	0.9813	0.9789	0.9758
180	0.9745	0.9754	0.9793
240	0.9769	0.9835	0.9840
360	0.9839	0.9840	0.9802
Tiomno (min)		x calculada	
Tiempo (mm) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.6034	0.6842	0.7846
30	0.8427	0.9003	0.9536
45	0.9376	0.9685	0.9900
60	0.9753	0.9901	0.9978
90	0.9961	0.9990	0.9999
120	0.9994	0.9999	1.0000
180	1.0000	1.0000	1.0000
240	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lipozyme[®] RM IM.

Tabla VIII.3- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Lipozyme[®] RM IM.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0567	0.0213	0.9977
70	0.0640	0.0184	0.9982
80	0.0787	0.0203	0.9980
Tiomno (min)		x experimental	
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5603	0.6155	0.6860
30	0.8443	0.8626	0.9217
45	0.9183	0.9435	0.9617
60	0.9491	0.9589	
90	0.9714	0.9739	0.9732
120	0.9705	0.9735	0.9724
180	0.9749	0.9736	0.9768
240	0.9780	0.9818	0.9767
360	0.9781	0.9812	0.9804
Tiomes (min)		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5729	0.6168	0.6927
30	0.8176	0.8532	0.9056
45	0.9221	0.9437	0.9710
60	0.9667	0.9784	0.9911
90	0.9939	0.9968	0.9992
120	0.9989	0.9995	0.9999
180	1.0000	1.0000	1.0000
240	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lipozyme[®] TL IM.

Tabla VIII.4- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 1 g de Lipozyme[®] TL IM.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0291	0.0255	0.9972
70	0.0382	0.0284	0.9964
80	0.0346	0.0255	0.9971
Tiomes (min)		x experimental	
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3175	0.3744	0.3511
30	0.5561	0.6933	0.6393
45	0.7467	0.8523	0.8197
60	0.8587	0.9322	0.9082
90	0.9548	0.9609	0.9666
120	0.9611	0.9750	0.9767
180	0.9704	0.9785	0.9833
240	0.9707	0.9822	0.9830
360	0.9838	0.9860	0.9867
Tiomes (min)		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3536	0.4361	0.4052
30	0.5822	0.6820	0.6462
45	0.7299	0.8207	0.7896
60	0.8254	0.8989	0.8749
90	0.9270	0.9679	0.9557
120	0.9695	0.9898	0.9843
180	0.9947	0.9990	0.9980
240	0.9991	0.9999	0.9998
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: Lewatit.

Tabla VIII.5- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Lewatit.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0331	0.0468	0.9910
70	0.0505	0.0265	0.9966
80	0.0584	0.0236	0.9973
Tiomno (min)		x experimental	
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.2796	0.4856	0.5428
30	0.6234	0.8084	0.8692
45	0.8235	0.9262	0.9443
60	0.9230	0.9593	0.9627
90	0.9694	0.9672	0.9780
120	0.9770	0.9742	0.9814
180	0.9809	0.9771	0.9855
240	0.9848	0.9780	0.9854
360	0.9848	0.9779	0.9854
Tionne (min)		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3909	0.5309	0.5834
30	0.6290	0.7799	0.8265
45	0.7740	0.8968	0.9277
60	0.8624	0.9516	0.9699
90	0.9489	0.9893	0.9948
120	0.9811	0.9977	0.9991
180	0.9974	0.9999	1.0000
240	0.9996	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: Amberlite.

Tabla VIII.6- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.5 g de Amberlite.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
60	0.0571	0.0149	0.9989		
70	0.0686	0.0139	0.9990		
80	0.0878	0.0143	0.9989		
Tiompo (min)		x experimental			
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C		
0	0.0000	0.0000	0.0000		
15	0.5791	0.6468	0.7387		
30	0.8217	0.8752	0.9239		
45	0.9248	0.9481	0.9671		
60	0.9543	0.9671	0.9779		
90	0.9737	0.9813	0.9819		
120	0.9811	0.9812	0.9818		
180	0.9809	0.9815	0.9852		
240	0.9814	0.9851	0.9852		
360	0.9810	0.9851	0.9853		
Tiome (min)		x calculada			
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C		
0	0.0000	0.0000	0.0000		
15	0.5754	0.6427	0.7320		
30	0.8197	0.8723	0.9282		
45	0.9235	0.9544	0.9808		
60	0.9675	0.9837	0.9948		
90	0.9941	0.9979	0.9996		
120	0.9989	0.9997	1.0000		
180	1.0000	1.0000	1.0000		
240	1.0000	1.0000	1.0000		
360	1.0000	1.0000	1.0000		

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 1090 M.

Tabla VIII.7- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.25 g de ECR 1090 M.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0468	0.0205	0.9979
70	0.0572	0.0204	0.9979
80	0.0674	0.0205	0.9978
Tiome (min)		x experimental	
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.4937	0.5640	0.6283
30	0.7600	0.8391	0.8862
45	0.8979	0.9292	0.9502
60	0.9349	0.9533	0.9618
90	0.9580	0.9650	0.9694
120	0.9694	0.9728	0.9730
180	0.9733	0.9767	0.9770
240	0.9772	0.9764	0.9771
360	0.9769	0.9803	0.9807
		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5046	0.5758	0.6360
30	0.7545	0.8201	0.8675
45	0.8784	0.9237	0.9518
60	0.9397	0.9676	0.9824
90	0.9852	0.9942	0.9977
120	0.9964	0.9990	0.9997
180	0.9998	1.0000	1.0000
240	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 8806 M.

Tabla VIII.8- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.25 g de ECR 8806 M.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)
60	0.0508	0.0172	0.9985
70	0.0651	0.0199	0.9979
80	0.0776	0.0205	0.9978
		x experimental	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5361	0.6249	0.6975
30	0.7810	0.8682	0.9012
45	0.9061	0.9390	0.9517
60	0.9454	0.9570	0.9663
90	0.9652	0.9708	0.9740
120	0.9724	0.9749	0.9738
180	0.9765	0.9746	0.9775
240	0.9804	0.9781	0.9774
360	0.9806	0.9784	0.9775
T :		x calculada	
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.5331	0.6231	0.6879
30	0.7820	0.8580	0.9026
45	0.8982	0.9465	0.9696
60	0.9525	0.9798	0.9905
90	0.9896	0.9971	0.9991
120	0.9977	0.9996	0.9999
180	0.9999	1.0000	1.0000
240	1.0000	1.0000	1.0000
360	1.0000	1.0000	1.0000

Determinación de la constante cinética global, k_r: ECR 8285 M.

Tabla VIII.9- Ajuste del modelo a la síntesis de espermaceti a diferentes temperaturas en el reactor de altas prestaciones, a 350 rpm con 0.25 g de ECR 8285 M.

Temperatura (°C)	k _r (min ⁻¹)	Error estándar (S)	Coeficiente de correlación (r)		
60	0.0559	0.0214	0.9976		
70	0.0704	0.0214	0.9976		
80	0.0826	0.0224	0.9973		
Tionne (min)		x experimental			
Tiempo (mm)	60 °C	70 °C	80 °C		
0	0.0000	0.0000	0.0000		
15	0.5686	0.6559	0.7184		
30	0.8235	0.8857	0.9129		
45	0.9173	0.9463	0.9610		
60	0.9449	0.9655	0.9690		
90	0.9684	0.9693	0.9728		
120	0.9724	0.9694	0.9728		
180	0.9724	0.9732	0.9728		
240	0.9724	0.9770	0.9728		
360	0.9724	0.9770	0.9728		
	x calculada				
Tiempo (min) —	60 °C	70 °C	80 °C		
0	0.0000	0.0000	0.0000		
15	0.5674	0.6520	0.7103		
30	0.8129	0.8789	0.9161		
45	0.9191	0.9579	0.9757		
60	0.9650	0.9853	0.9930		
90	0.9934	0.9982	0.9994		
120	0.9988	0.9998	1.0000		
180	1.0000	1.0000	1.0000		
240	1.0000	1.0000	1.0000		
360	1.0000	1.0000	1.0000		

Determinación de la constante cinética global a través de las constantes de los ésteres por separado.

Tabla VIII.10- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con CalB immo Plus a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0826	15.31	0.0126
Miristato de cetilo	0.0781	37.76	0.0295
Palmitato de cetilo	0.0696	38.78	0.0270
Estearato de cetilo	0.0680	8.16 0	
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0747
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0744

Tabla VIII.11- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con Novozym[®] 435 a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0874	15.31	0.0134
Miristato de cetilo	0.0829	37.76	0.0313
Palmitato de cetilo	0.0893	38.78	0.0346
Estearato de cetilo	0.0859	8.16	0.0070
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0863
Espermaceti, k _r modelo (min ⁻¹)			0.0768

Tabla VIII.12- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con Lipozyme[®] RM IM a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	$\begin{array}{c} Contribución \ a \ k_r \\ (min^{-1}) \end{array}$	
Laurato de cetilo	0.0620	15.31	0.0095	
Miristato de cetilo	0.0605	37.76	0.0229	
Palmitato de cetilo	0.0659	38.78	0.0256	
Estearato de cetilo	0.0543	8.16 (
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0623	
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0640	

Tabla VIII.13- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con Lipozyme[®] TL IM a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0357	15.31	0.0055
Miristato de cetilo	0.0405	37.76	0.0153
Palmitato de cetilo	0.0380	38.78	0.0147
Estearato de cetilo	0.0356	8.16	0.0029
Espermaceti, k _r media (min ⁻¹)			0.0384
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0382

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0514	15.31	0.0079
Miristato de cetilo	0.0515	37.76	0.0194
Palmitato de cetilo	0.0496	38.78	0.0193
Estearato de cetilo	0.0457	8.16	0.0037
Espermaceti, k _r media (min ⁻¹)			0.0503
Espermaceti, k _r modelo (min ⁻¹) 0.0505		0.0505	

Tabla VIII.14- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con Lewatit a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Tabla VIII.15- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con Amberlite a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)	
Laurato de cetilo	0.0706	15.31	0.0108	
Miristato de cetilo	0.0663	37.76	0.0250	
Palmitato de cetilo	0.0639	38.78	0.0248	
Estearato de cetilo	0.0621	8.16	0.0051	
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0657	
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0686	

Tabla VIII.16- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con ECR 1090 M a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Compuesto Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)		$\begin{array}{c} \text{Contribución a } k_r \\ (\text{min}^{-1}) \end{array}$	
Laurato de cetilo	0.0587	15.31	0.0090	
Miristato de cetilo	0.0669	37.76	0.0253	
Palmitato de cetilo	0.0632	38.78	0.0245	
Estearato de cetilo	0.0569	8.16	0.0046	
Espermaceti, k _r media (min ⁻¹)			0.0634	
Espermaceti, k _r modelo (min ⁻¹)			0.0572	

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0680	15.31	0.0104
Miristato de cetilo	0.0637	37.76	0.0240
Palmitato de cetilo	0.0616	38.78	0.0239
Estearato de cetilo	0.0626	8.16	0.0051
Espermaceti, k _r media (min ⁻¹)			0.0634
Espermaceti, k _r mode	elo (min ⁻¹)		0.0651

Tabla VIII.17- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con ECR 8806 M a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Tabla VIII.18- Cálculo de la constante cinética global de la síntesis de espermaceti a 70 °C con ECR 8285 M a partir las constantes de velocidad de cada uno de los ésteres cetílicos.

Compuesto	Constante cinética global, k _r (min ⁻¹)	% en el espermaceti	Contribución a k _r (min ⁻¹)
Laurato de cetilo	0.0590	15.31	0.0090
Miristato de cetilo	0.0704	37.76	0.0266
Palmitato de cetilo	0.0554	38.78	0.0215
Estearato de cetilo	0.0582	8.16	0.0048
Espermaceti, k _r medi	a (min ⁻¹)		0.0618
Espermaceti, k _r modelo (min ⁻¹)			0.0704

Anexo IX

Resultados de la evaluación del blanco de ballena y sus ésteres como ingredientes cosméticos.

Análisis por HPLC de los ésteres enzimáticos.

Tabla IX.1- Análisis por HPLC del ácido láurico.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AL	1.132	1290921	100	286822	212.5
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AL	1.139	1350829	100	300099	212.5

Tabla IX.2- Análisis por HPLC del ácido mirístico.

	Name Retention Time (min)		Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AM 1.262		1203539	100	238854	212.5
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AM	1.269	1196527	100	243403	212.5

Tabla IX.3- Análisis por HPLC del ácido palmítico.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AP	1.451	1036940	100	195425	212.5
	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Peak Lambda Max.
1	AP	1.434	1040649	100	195438	234.7

Tabla IX.4- Análisis por HPLC del ácido esteárico.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AE 1.704		898683	100	154355	257.1
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AE	1.673	883471	100	154326	212.5

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	LC 5.474		1010492	100	96332	212.5
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	LC	5.42	1017096	100	96679	212.5
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	LC	5.435	1014157	100	96748	212.5

Tabla IX.5- Análisis por HPLC del laurato de cetilo.

Tabla IX.6- Análisis por HPLC del miristato de cetilo.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	MC 7.031		795928	100	53863	247.7
	Name	Name Retention Time (min)		Area % Area		Peak Lambda Max (nm)
1	MC	7.064		100	58859	277.1
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	MC	7.098	847154	100	57351	274.8

Tabla IX.7- Análisis por HPLC del palmitato de cetilo.

	Name	Name Retention Time (min)		% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	PC 9.4		768139	100	34711	276
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	PC	PC 9.441		100	34665	268.9
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	PC	9.446	722395	100	33805	268.9

Tabla IX.8- Análisis por HPLC del estearato de cetilo.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	EC	C 12.294		100	13826	265.3
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	EC	EC 12.458		100	9486	270.1
	Name Retention Time (min)		Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	EC	12.539	303491	100	9084	274.8

Análisis por HPLC del espermaceti biotecnológico.

Tabla IX.9- Análisis por HPLC de una muestra de espermaceti extraída a los 15 min de reacción.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AL	1.13	14860	2.05	3968	265.3
2	AM	1.262	33943	4.67	8323	283.1
3	AP	1.439	33331	4.59	7426	243
4	AE	1.696	6412	0.88	1380	259.4
5	LC	5.494	124595	17.15	11202	263
6	MC	7.245	254926	35.1	18150	259.4
7	PC	9.645	226918	31.24	12705	263
8	EC	12.828	31339	4.31	1584	271.2
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AL	1.12	4710	0.68	1537	281.9
2	AM	1.253	25022	3.63	5845	252.4
3	AP	1.436	25419	3.69	5526	289
4	AE	1.691	1521	0.22	394	280.7
5	LC	5.332	122871	17.83	12061	266.5
6	MC	7.021	257218	37.33	20327	266.5
7	PC	9.337	222213	32.25	14405	246.5
8	EC	12.375	30112	4.37	1920	259.4
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	AL	1.133	32821	2.2	8905	251.2
2	AM	1.264	107303	7.19	23925	261.8
3	AP	1.449	104593	7.01	21316	272.4
4	AE	1.698	11285	0.76	2330	281.9
5	LC	5.469	232273	15.57	20520	251.2
6	MC	7.224	487150	32.65	32792	281.9
7	PC	9.639	429825	28.8	23137	263
8	EC	12.778	86990	5.83	3948	276

Tabla IX.10- Análisis por HPLC de una muestra de espermaceti final.

	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	LC	5.395	165452	19.18	15308	278.3
2	MC	7.097	337707	39.15	26322	274.8
3	PC	9.429	304315	35.28	19425	278.3
4	EC	12.454	55060	6.38	3066	258.3
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1	LC	5.349	153054	19.07	14575	253.6
2	MC	7.045	329656	41.08	25340	296.1
3	PC	9.366	277810	34.62	18205	273.6
4	EC	12.389	41945	5.23	2533	274.8
	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height (µV)	Peak Lambda Max (nm)
1		1.367	30631	3.34	4893	251.2
2	LC	5.314	159776	17.4	15294	265.3
3	MC	6.997	340247	37.06	27355	247.7
4	PC	9.299	331854	36.14	20818	271.2
5	EC	12.283	55649	6.06	3102	285.4

Estudio de la textura de las emulsiones: consistencia y firmeza.

Tabla IX.11- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema control.

Donotición	10	°C	20 °C		30 °C	
Repetition -	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	27.40	62.74	14.60	36.75	11.82	28.62
2	25.61	63.28	14.90	37.29	11.95	28.92
3	25.48	62.10	14.49	36.16	11.73	28.62
4	22.09	55.15	13.86	34.35	12.19	28.27
5	23.87	58.41				
Media	24.89	60.34	14.46	36.14	11.92	28.61
Desviación estándar	2.01	3.47	0.43	1.28	0.20	0.27

Donatiaián	40	°C	50 °C		
Kepeticion -	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	
1	7.74	18.75	6.33	14.16	
2	7.37	18.39	5.26	12.88	
3	7.20	18.14	5.02	12.08	
4	7.22	18.06	5.24	12.59	
5			4.96	12.06	
Media	7.38	18.33	5.36	12.75	
Desviación estándar	0.25	0.31	0.56	0.86	

Tabla IX.12- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema de laurato de cetilo.

Donotición	10	°C	20 °C		30 °C	
Kepeucion –	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	168.88	350.86	101.84	213.20	21.43	50.93
2	169.36	437.35	104.62	232.96	19.30	46.85
3	159.85	377.16	103.55	227.12	18.99	48.12
4	164.83	352.67	100.26	210.16	21.76	55.39
5					18.35	48.29
Media	165.73	379.51	102.56	220.86	19.97	49.92
Desviación estándar	4.42	40.38	1.92	10.93	1.53	3.40

Repetición -	40 °C		50 °C	
	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	7.94	17.46	6.06	13.16
2	7.15	16.26	6.24	13.63
3	6.85	16.12	5.47	12.37
4	6.95	16.10	5.32	12.07
5			5.42	12.25
Media	7.23	16.48	5.70	12.70
Desviación estándar	0.49	0.65	0.419	0.667

Tabla IX.12- Continuación.

Tabla IX.13- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema de miristato de cetilo.

Repetición –	10 °C		20 °C		30 °C	
	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	115.49	257.81	93.68	196.21	77.44	165.94
2	112.58	252.76	91.48	190.00	77.64	164.67
3	113.08	260.73	93.49	195.47	79.85	173.90
4	113.24	245.76	93.67	191.49	78.97	163.03
Media	113.60	254.26	93.08	193.29	78.47	166.88
Desviación estándar	1.29	6.56	1.07	3.02	1.14	4.83

Repetición –	40 °C		50 °C			
	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)		
1	23.12	53.72	5.31	11.73		
2	22.03	50.67	5.05	11.31		
3	19.69	44.08	4.76	10.97		
4	26.22	61.25	4.75	10.96		
5	25.07	59.51	4.85	11.15		
Media	23.23	53.84	4.94	11.23		
Desviación estándar	2.56	6.93	0.24	0.32		
Repetición –	10 °C		20 °C		30 °C	
---------------------	-------------------------	----------	--------	----------	-------------------------	----------
	F + (g)	A+ (g.s)	F+ (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	45.34	107.00	37.28	90.06	27.87	68.11
2	46.53	112.30	35.78	87.22	28.98	69.35
3	41.15	90.82	32.70	76.17	26.21	64.25
4	50.26	107.15	37.27	81.14	27.59	67.49
Media	45.82	104.32	35.76	83.65	27.66	67.30
Desviación estándar	3.75	9.33	2.16	6.22	1.14	2.17

Tabla IX.14- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema de palmitato de cetilo.

Donotioión	40	°C	50 °C	
Kepeticion -	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	11.95	28.02	5.36	12.68
2	10.95	26.51	5.23	12.14
3	11.67	28.11	5.35	12.51
4	11.80	31.26	5.64	12.94
Media	11.59	28.48	5.40	12.57
Desviación estándar	0.44	1.99	0.17	0.34

Tabla IX.15- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema de estearato de cetilo.

Repetición –	10 °C		20 °C		30 °C	
	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	60.69	142.76	46.70	103.37	35.39	80.94
2	66.60	159.50	48.81	111.55	36.99	86.04
3	64.05	150.23	49.09	110.20	37.21	87.28
4	65.32	148.96	47.33	106.51	38.01	84.79
Media	64.17	150.36	47.98	107.90	36.90	84.76
Desviación estándar	2.54	6.91	1.15	3.70	1.10	2.74

Donotición -	40	°C	50 °C	
Repeticion	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	21.41	51.98	10.49	25.83
2	22.57	57.32	9.19	23.11
3	24.27	60.07	9.66	23.60
4	24.91	61.95	9.29	22.98
Media	23.29	57.83	9.66	23.88
Desviación estándar	1.60	4.34	0.59	1.33

Tabla IX.15- Continuación.

Tabla IX.16- Resultados de los ensayos de penetración a distintas temperaturas para la crema de espermaceti.

Repetición –	10 °C		20 °C		30 °C	
	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	67.71	154.02	46.33	98.89	28.25	61.69
2	67.11	158.21	44.20	95.81	27.19	59.63
3	65.04	151.11	42.77	90.89	28.27	62.57
4	64.15	143.22	42.01	90.24		
Media	66.00	151.64	43.83	93.96	27.90	61.30
Desviación estándar	1.68	6.33	1.90	4.12	0.62	1.51

Donotición	40	°C	50 °C	
Kepeticion –	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	10.43	23.64	6.31	14.31
2	9.51	21.57	4.97	11.53
3	10.16	24.54	5.12	12.25
4	10.37	24.86	5.22	12.11
Media	10.12	23.65	5.40	12.55
Desviación estándar	0.42	1.48	0.61	1.21

Donotición	Biotec	nológico	Comercial	
Repetición –	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	40.91	87.73	38.40	85.74
2	38.26	86.22	39.03	87.31
3	37.89	84.25	37.94	85.28
4	39.31	87.82	38.76	87.50
Media	39.09	86.51	38.53	86.46
Desviación estándar	1.35	1.67	0.47	1.11

Tabla IX.17- Resultados de los ensayos de penetración a temperatura ambiente para la crema de laurato de cetilo biotecnológico y comercial.

Tabla IX.18- Resultados de los ensayos de penetración a temperatura ambiente para la crema de palmitato de cetilo biotecnológico y comercial.

Donatición	Bioteci	nológico	Comercial	
Repeticion	F + (g)	A+ (g.s)	F + (g)	A+ (g.s)
1	31.06	75.45	60.55	137.49
2	35.11	81.93	58.68	124.36
3	32.38	82.04	53.94	122.63
4	34.59	79.84	65.88	151.89
5	33.60	77.63		
Media	33.35	79.38	59.76	134.09
Desviación estándar	1.65	2.84	4.94	13.59

Estudio de la textura de las emulsiones: extensibilidad.

Tabla IX.19- Resultados de los ensayos de extensibilidad a temperatura ambiente para las distintas cremas.

			Área (g.s)		
Repetición	Laurato de cetilo	Miristato de cetilo	Palmitato de cetilo	Estearato de cetilo	Espermaceti
1	1314.14	1341.95	1352.10	1361.05	1458.90
2	1302.89	1207.58	1517.37	1381.24	1354.32
3	1280.75	1407.84	1463.37	1405.31	1534.87
4	1378.42	1421.84	1542.90	1391.86	1353.83
5	1287.80	1325.91	1433.72	1387.03	1319.48
Media	1312.80	1341.02	1461.89	1385.30	1404.28
Desviación estándar	38.92	85.19	74.98	16.21	89.82

		Área (g.s)	
Repetición	Control	Laurato de cetilo comercial	Palmitato de cetilo comercial
1	611.50	1435.56	1331.62
2	496.90	1332.19	1398.35
3	446.47	1371.46	1368.25
4	449.35	1392.13	1400.41
5	569.07	1447.90	1388.78
Media	514.66	1395.85	1377.48
Desviación estándar	73.43	47.29	28.63

Estudio de la microestructura de las cremas: granulometría.

Tabla IX.20- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema control.

D onatición		Diámetro (µm)	
Repetition	D10	D50	D90
1	0.79	12.6	43.7
2	1.12	17.7	56.4
3	1.00	16.5	41.7
4	0.59	14.3	39.6
Media	0.87	15.3	45.3
Desviación estándar	0.23	2.3	7.5

Tabla IX.21- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema de laurato de cetilo.

Repetición –		Diámetro (µm)	
	D10	D50	D90
1	1.5	13.4	47.3
2	1.2	12.0	45.8
3	0.8	12.9	48.1
Media	1.2	12.7	47.1
Desviación estándar	0.4	0.7	1.1

Tabla IX.22- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema de miristato de cetilo.

Dan ati ai án		Diámetro (µm)	
Kepeucion —	D10	D50	D90
1	4.0	19.1	48.3
2	3.8	17.8	47.4
3	3.5	16.9	44.6
4	3.7	18.8	51.2
Media	3.7	18.2	47.8
Desviación estándar	0.2	1.0	2.7

Donotición		Diámetro (µm)	
Kepeticion	D10	D50	D90
1	5.5	34.9	74.2
2	6.1	34.7	73.1
3	7.8	33.8	70.3
Media	6.5	34.5	72.5
Desviación estándar	1.2	0.5	2.0

Tabla IX.23- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema de palmitato de cetilo.

Tabla IX.24- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema de estearato de cetilo.

Donotición -		Diámetro (µm)	
Repetición —	D10	D50	D90
1	4.1	13.0	36.0
2	4.1	14.5	38.4
3	3.7	13.5	37.3
Media	3.9	13.7	37.2
Desviación estándar	0.2	0.8	1.2

Tabla IX.25- Medidas características del tamaño de gota de la fase dispersa de la crema de espermaceti.

Donotición		Diámetro (µm)	
Kepeucion —	D10	D50	D90
1	2.3	17.8	52.7
2	2.2	17.5	52.5
3	2.3	16.1	45.4
4	2.2	17.6	47.0
5	2.3	17.5	46.7
Media	2.2	17.3	48.9
Desviación estándar	0.1	0.7	3.5

Anexo X

Resultados del estudio económico de la síntesis de espermaceti bajo condiciones óptimas.

Determinación del coste de operación de los equipos.

Tabla X.1- Determinación del coste de la energía consumida por el agitador orbital Infors HT durante el proceso de activación.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Suma intensidad (A)	Valor medio intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
0	0.1	0.1				
1	0.2	0.3				
2	0.0	0.3	0.2	33.0	1.83×10^{-05}	0.0001
3	0.3	0.6	0.2	44.0	3.67×10^{-05}	0.0002
4	0.0	0.6	0.2	33.0	3.67×10^{-05}	0.0001
5	0.0	0.6	0.1	26.4	3.67×10^{-05}	0.0001
6	0.0	0.6	0.1	22.0	3.67×10^{-05}	0.0001
7	0.0	0.6	0.1	18.9	3.67×10^{-05}	0.0001
8	0.4	1.0	0.1	27.5	6.11×10^{-05}	0.0001
9	0.0	1.0	0.1	24.4	6.11x10 ⁻⁰⁵	0.0001
10	0.0	1.0	0.1	22.0	6.11x10 ⁻⁰⁵	0.0001
11	0.0	1.0	0.1	20.0	6.11×10^{-05}	0.0001
12	0.1	1.1	0.1	20.2	6.72×10^{-05}	0.0001
13	0.0	1.1	0.1	18.6	6.72×10^{-05}	0.0001
14	0.2	1.3	0.1	20.4	7.94x10 ⁻⁰⁵	0.0001
15	0.4	1.7	0.1	24.9	1.04×10^{-04}	0.0001
16	0.0	1.7	0.1	23.4	1.04×10^{-04}	0.0001
17	0.1	1.8	0.1	23.3	1.10×10^{-04}	0.0001
18	0.0	1.8	0.1	22.0	1.10×10^{-04}	0.0001
19	0.0	1.8	0.1	20.8	1.10×10^{-04}	0.0001
20	0.7	2.5	0.1	27.5	1.53×10^{-04}	0.0001
21	0.0	2.5	0.1	26.2	1.53×10^{-04}	0.0001
22	0.5	3.0	0.1	30.0	1.83×10^{-04}	0.0001
23	0.0	3.0	0.1	28.7	1.83×10^{-04}	0.0001
24	0.0	3.0	0.1	27.5	1.83×10^{-04}	0.0001
25	0.0	3.0	0.1	26.4	1.83×10^{-04}	0.0001
26	0.0	3.0	0.1	25.4	1.83×10^{-04}	0.0001
27	0.0	3.0	0.1	24.4	1.83×10^{-04}	0.0001
28	0.5	3.5	0.1	27.5	2.14×10^{-04}	0.0001
29	0.0	3.5	0.1	26.6	2.14×10^{-04}	0.0001

Tabla X.1- Continuación.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Suma intensidad (A)	Valor medio intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
30	0.0	3.5	0.1	25.7	2.14×10^{-04}	0.0001
31	0.2	3.7	0.1	26.3	2.26×10^{-04}	0.0001
32	0.0	3.7	0.1	25.4	2.26×10^{-04}	0.0001
33	0.2	3.9	0.1	26.0	2.38×10^{-04}	0.0001
34	0.0	3.9	0.1	25.2	2.38×10^{-04}	0.0001
35	0.0	3.9	0.1	24.5	2.38×10^{-04}	0.0001
36	0.0	3.9	0.1	23.8	2.38×10^{-04}	0.0001
37	0.2	4.1	0.1	24.4	2.51×10^{-04}	0.0001
38	0.0	4.1	0.1	23.7	2.51×10^{-04}	0.0001
39	0.1	4.2	0.1	23.7	2.57×10^{-04}	0.0001
40	0.0	4.2	0.1	23.1	2.57×10^{-04}	0.0001
41	0.1	4.3	0.1	23.1	2.63×10^{-04}	0.0001
42	0.0	4.3	0.1	22.5	2.63×10^{-04}	0.0001
43	0.0	4.3	0.1	22.0	2.63×10^{-04}	0.0001
44	0.0	4.3	0.1	21.5	2.63×10^{-04}	0.0001
45	0.3	4.6	0.1	22.5	2.81×10^{-04}	0.0001
46	0.0	4.6	0.1	22.0	2.81×10^{-04}	0.0001
47	0.3	4.9	0.1	22.9	2.99×10^{-04}	0.0001
48	0.2	5.1	0.1	23.4	3.12×10^{-04}	0.0001
49	0.0	5.1	0.1	22.9	3.12×10^{-04}	0.0001
50	0.2	5.3	0.1	23.3	3.24×10^{-04}	0.0001
51	0.0	5.3	0.1	22.9	3.24×10^{-04}	0.0001
52	0.4	5.7	0.1	24.1	3.48×10^{-04}	0.0001
53	0.0	5.7	0.1	23.7	3.48×10^{-04}	0.0001
54	0.1	5.8	0.1	23.6	3.54×10^{-04}	0.0001
55	0.0	5.8	0.1	23.2	3.54×10^{-04}	0.0001
56	0.0	5.8	0.1	22.8	3.54×10^{-04}	0.0001
57	0.2	6.0	0.1	23.2	3.67×10^{-04}	0.0001
58	0.0	6.0	0.1	22.8	3.67×10^{-04}	0.0001
59	0.0	6.0	0.1	22.4	3.67×10^{-04}	0.0001
60	0.1	6.1	0.1	22.4	3.73×10^{-04}	0.0001
61	0.4	6.5	0.1	23.4	3.97×10^{-04}	0.0001
62	0.0	6.5	0.1	23.1	3.97×10^{-04}	0.0001
63	0.0	6.5	0.1	22.7	3.97×10^{-04}	0.0001
64	0.2	6.7	0.1	23.0	4.09×10^{-04}	0.0001
65	0.0	6.7	0.1	22.7	4.09×10^{-04}	0.0001

Consumo según	Máxima	Intensidad	Consumo	Velocidad de	Consumo
especificación	velocidad	estimada según	unitario	recirculación	estimado
(VA)	(rpm)	especificación (A)	(A/rpm)	(rpm)	(A)
100	220	0.45	0.0021	12	0.02

Tabla X.2- Determinación del coste de la energía consumida por una bomba peristáltica 505 Du durante el proceso de inmovilización.

Tabla X.3- Determinación del coste de la energía consumida por el criostato de Thermo Electron Corporation durante el proceso de inmovilización.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Suma intensidad (A)	Valor medio intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
0.0	1.6		1.6	352.0	0	
1860.0	1.6	2976	1.6	352.0	0.1819	0.0012
1860.5	2.8					
1861.0	1.5	4.3				
1861.5	2.7	7.0	2.3	513.3	0.2654	0.0018
1862.0	1.4	8.4	2.1	462.0	0.2390	0.0016
1862.5	3.8	12.2	2.4	536.8	0.2777	0.0019
1863.0	1.5	13.7	2.3	502.3	0.2600	0.0017
1863.5	3.4	17.1	2.4	537.4	0.2782	0.0019
1864.0	1.5	18.6	2.3	511.5	0.2648	0.0018
1864.5	3.8	22.4	2.5	547.6	0.2836	0.0019
1865.0	1.7	24.1	2.4	530.2	0.2747	0.0018
1865.5	3.8	27.9	2.5	558.0	0.2892	0.0019
1866.0	1.6	29.5	2.5	540.8	0.2803	0.0019
1866.5	3.4	32.9	2.5	556.8	0.2887	0.0019
1867.0	1.8	34.7	2.5	545.3	0.2828	0.0019
1867.5	3.5	38.2	2.5	560.3	0.2906	0.0019
1868.0	1.7	39.9	2.5	548.6	0.2847	0.0019
1868.5	2.2	42.1	2.5	544.8	0.2828	0.0019
1869.0	1.3	43.4	2.4	530.4	0.2754	0.0018
1869.5	2.2	45.6	2.4	528.0	0.2742	0.0018
1870.0	1.5	47.1	2.4	518.1	0.2691	0.0018
1870.5	2.5	49.6	2.4	519.6	0.2700	0.0018
1871.0	1.6	51.2	2.3	512.0	0.2661	0.0018
1871.5	2.6	53.8	2.3	514.6	0.2675	0.0018
1872.0	1.6	55.4	2.3	507.8	0.2641	0.0018
1872.5	3.1	58.5	2.3	514.8	0.2678	0.0018
1873.0	1.8	60.3	2.3	510.2	0.2655	0.0018
1873.5	3.2	63.5	2.4	517.4	0.2693	0.0018
1874.0	1.6	65.1	2.3	511.5	0.2663	0.0018
1874.5	3.5	68.6	2.4	520.4	0.2710	0.0018

Valor medio Suma Tiempo Intensidad Potencia Energía Coste intensidad intensidad (kWh) (€/min) **(s) (A) (W) (A) (A)** 1875.0 70.2 2.3 514.8 0.2681 0.0018 1.6 1875.5 3.4 73.6 2.4 522.3 0.2721 0.0018 517.0 1876.0 1.6 75.2 2.4 0.2694 0.0018 1876.5 2.2 77.4 2.3 516.0 0.2690 0.0018 1877.0 1.5 78.9 2.3 510.5 0.2662 0.0018 1877.5 2.6 81.5 2.3 512.3 0.2672 0.0018 509.1 1878.0 1.8 83.3 2.3 0.2656 0.0018 1878.5 2.8 86.1 2.3 511.9 0.2671 0.0018 87.6 1879.0 2.3 507.2 1.5 0.2647 0.0018 1879.5 3.3 90.9 2.3 512.8 0.2677 0.0018 1880.0 1.5 92.4 2.3 508.2 0.2654 0.0018 1880.5 3.3 95.7 2.3 513.5 0.2682 0.0018 1881.0 1.5 97.2 2.3 509.1 0.2660 0.0018 509.1 1881.5 2.3 99.5 2.3 0.2661 0.0018 1882.0 1.5 101.0 2.3 505.0 0.2640 0.0018 2.1 2.3 1882.5 103.1 504.0 0.2636 0.0018 1883.0 104.7 2.3 500.7 0.2619 0.0017 1.6 1883.5 3.0 107.7 2.3 504.1 0.0018 0.2638 1884.0 1.9 109.6 2.3 502.3 0.2629 0.0017 1884.5 3.0 112.6 2.3 505.6 0.2646 0.0018 1885.0 1.7 2.3 502.9 0.2633 0.0017 114.3 117.7 507.7 1885.5 3.4 2.3 0.2659 0.0018 1.4 503.9 1886.0 119.1 2.3 0.2640 0.0018 3.4 122.5 2.3 508.5 1886.5 0.2665 0.0018 2.1 507.6 1887.0 124.6 2.3 0.2661 0.0018 1887.5 3.1 127.7 2.3 510.8 0.2678 0.0018 1888.0 1.5 129.2 2.3 507.6 0.2662 0.0018 1888.5 2.6 131.8 2.3 508.7 0.2669 0.0018 1889.0 1.7 133.5 2.3 506.4 0.2657 0.0018 2.1 2.3 505.6 0.2654 1889.5 135.6 0.0018 1890.0 137.3 2.3 503.4 1.7 0.2643 0.0018 1890.5 505.6 2.9 140.2 2.3 0.2655 0.0018 1891.0 1.3 141.5 2.3 502.1 0.2637 0.0017 1891.5 3.6 145.1 2.3 506.7 0.2662 0.0018 1892.0 1.4 146.5 2.3 503.6 0.2647 0.0018 2.3 1892.5 3.6 150.1 508.0 0.2671 0.0018 505.0 1893.0 1.4 151.5 2.3 0.2655 0.0018 1893.5 3.6 155.1 2.3 509.3 0.2679 0.0018 1894.0 1.6 156.7 2.3 507.0 0.2667 0.0018 1894.5 160.1 2.3 510.5 0.2686 0.0018 3.4

Tabla X.3- Continuación.

Tabla X.4- Determinación del coste de la energía consumida por el baño termostático de PolyScience durante la reacción.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Suma intensidad (A)	Valor medio intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
0	8.7		8.7	1903.0	0	
300	8.6	2595	8.7	1903.0	0.1586	0.0066
600	8.05	5010	8.4	1837.0	0.3062	0.0064
601	0.8	0.8				
602	0.8	1.6	0.8	176.0	0.0001	0.0006
603	1.1	2.7	0.9	198.0	0.0002	0.0007
604	1.7	4.4	1.1	242.0	0.0003	0.0008
605	2.9	7.3	1.5	321.2	0.0004	0.0011
606	3.9	11.2	1.9	410.7	0.0007	0.0014
607	4.2	15.4	2.2	484.0	0.0009	0.0017
608	4.0	19.4	2.4	533.5	0.0012	0.0019
609	3.6	23.0	2.6	562.2	0.0014	0.0020
610	3.0	26.0	2.6	572.0	0.0016	0.0020
611	1.9	27.9	2.5	558.0	0.0017	0.0019
612	1.6	29.5	2.5	540.8	0.0018	0.0019
613	1.3	30.8	2.4	521.2	0.0019	0.0018
614	1.0	31.8	2.3	499.7	0.0019	0.0017
615	0.7	32.5	2.2	476.7	0.0020	0.0017
616	1.5	34.0	2.1	467.5	0.0021	0.0016
617	2.6	36.6	2.2	473.6	0.0022	0.0016
618	3.5	40.1	2.2	490.1	0.0025	0.0017
619	3.8	43.9	2.3	508.3	0.0027	0.0018
620	3.6	47.5	2.4	522.5	0.0029	0.0018
621	3.1	50.6	2.4	530.1	0.0031	0.0018
622	2.7	53.3	2.4	533.0	0.0033	0.0019
623	2.2	55.5	2.4	530.9	0.0034	0.0018
624	1.7	57.2	2.4	524.3	0.0035	0.0018
625	1.4	58.6	2.3	515.7	0.0036	0.0018
626	0.8	59.4	2.3	502.6	0.0036	0.0017
627	1.0	60.4	2.2	492.1	0.0037	0.0017
628	1.6	62.0	2.2	487.1	0.0038	0.0017
629	2.8	64.8	2.2	491.6	0.0040	0.0017
630	3.8	68.6	2.3	503.1	0.0042	0.0017
631	4.1	72.7	2.3	515.9	0.0044	0.0018
632	4.0	76.7	2.4	527.3	0.0047	0.0018
633	3.6	80.3	2.4	535.3	0.0049	0.0019
34	3.0	83.3	2.5	539.0	0.0051	0.0019
35	2.5	85.8	2.5	539.3	0.0052	0.0019
36	2.0	87.8	2.4	536.6	0.0054	0.0019

Tabla X.4- Continuación.

Tiempo	Intensidad	Suma intensided	Valor medio	Potencia	Energía	Coste
(s)	(A)	(A)	(A)	(W)	(kWh)	(€/min)
637	1.5	89.3	2.4	531.0	0.0055	0.0018
638	1.2	90.5	2.4	523.9	0.0055	0.0018
639	1.3	91.8	2.4	517.8	0.0056	0.0018
640	1.3	93.1	2.3	512.1	0.0057	0.0018
641	2.6	95.7	2.3	513.5	0.0058	0.0018
642	3.5	99.2	2.4	519.6	0.0061	0.0018
643	3.9	103.1	2.4	527.5	0.0063	0.0018
644	3.8	106.9	2.4	534.5	0.0065	0.0019
645	3.4	110.3	2.5	539.2	0.0067	0.0019
646	2.9	113.2	2.5	541.4	0.0069	0.0019
647	2.3	115.5	2.5	540.6	0.0071	0.0019
648	1.9	117.4	2.4	538.1	0.0072	0.0019
649	1.4	118.8	2.4	533.4	0.0073	0.0019
650	1.1	119.9	2.4	527.6	0.0073	0.0018
651	1.1	121.0	2.4	522.0	0.0074	0.0018
652	0.8	121.8	2.3	515.3	0.0074	0.0018
653	2.4	124.2	2.3	515.5	0.0076	0.0018
654	3.4	127.6	2.4	519.9	0.0078	0.0018
655	3.9	131.5	2.4	526.0	0.0080	0.0018
656	3.8	135.3	2.4	531.5	0.0083	0.0018
657	3.4	138.7	2.4	535.3	0.0085	0.0019
658	2.9	141.6	2.4	537.1	0.0087	0.0019
659	2.4	144.0	2.4	536.9	0.0088	0.0019
660	1.9	145.9	2.4	535.0	0.0089	0.0019
661	1.6	147.5	2.4	532.0	0.0090	0.0018
662	1.2	148.7	2.4	527.6	0.0091	0.0018
663	1.0	149.7	2.4	522.8	0.0091	0.0018
664	1.0	150.7	2.4	518.0	0.0092	0.0018
665	2.3	153.0	2.4	517.8	0.0094	0.0018
666	3.4	156.4	2.4	521.3	0.0096	0.0018
667	4.1	160.5	2.4	527.0	0.0098	0.0018
668	4.1	164.6	2.4	532.5	0.0101	0.0019
669	3.7	168.3	2.4	536.6	0.0103	0.0019
670	3.2	171.5	2.5	539.0	0.0105	0.0019
671	2.6	174.1	2.5	539.5	0.0106	0.0019
672	2.1	176.2	2.4	538.4	0.0108	0.0019
673	1.7	177.9	2.4	536.1	0.0109	0.0019
674	1.2	179.1	2.4	532.5	0.0109	0.0019
675	1.2	180.3	2.4	528.9	0.0110	0.0018
676	1.0	181.3	2.4	524.8	0.0111	0.0018

Valor medio Suma Tiempo Intensidad Potencia Energía Coste intensidad intensidad (kWh) (€/min) **(s) (A) (W) (A) (A)** 677 2.2 183.5 2.4 524.3 0.0112 0.0018 678 3.3 2.4 526.9 0.0114 0.0018 186.8 679 3.9 190.7 2.4 531.1 0.0117 0.0018 680 3.9 194.6 2.4 535.2 0.0119 0.0019 681 3.5 198.1 2.4 538.0 0.0121 0.0019 682 3.0 201.1 2.5 539.5 0.0123 0.0019 683 2.4 203.5 2.5 539.4 0.0124 0.0019 684 1.9 205.4 2.4 538.0 0.0126 0.0019 206.9 535.5 685 1.5 2.4 0.0126 0.0019 1.1 208.0 2.4 532.1 0.0127 0.0018 686 687 0.9 208.9 2.4 528.3 0.0128 0.0018 688 0.6 209.5 2.4 523.8 0.0128 0.0018 689 2.2 211.7 2.4 523.3 0.0129 0.0018 690 215.0 525.6 0.0131 0.0018 3.3 2.4 691 3.9 218.9 2.4 529.2 0.0134 0.0018 222.5 532.1 692 3.6 2.4 0.0136 0.0018 3.4 225.9 2.4 534.4 0.0138 0.0019 693 694 228.9 2.4 535.7 0.0140 0.0019 3.0 695 2.5 231.4 2.4 535.9 0.0141 0.0019 696 2.5 233.9 2.4 536.0 0.0143 0.0019 697 1.9 235.8 2.4 534.8 0.0144 0.0019 237.3 532.7 698 1.5 2.4 0.0145 0.0019 2.4 529.8 0.0146 699 1.1 238.4 0.0018 0.8 700 239.2 2.4 526.2 0.0146 0.0018 701 240.9 524.7 1.7 2.4 0.0147 0.0018 702 3.0 243.9 2.4 526.1 0.0149 0.0018 703 3.9 247.8 2.4 529.3 0.0151 0.0018 704 4.2 252.0 2.4 533.1 0.0154 0.0019 255.3 705 3.3 2.4 534.9 0.0156 0.0019 0.0158 706 2.9 258.2 535.9 0.0019 2.4 707 535.8 0.0159 2.4 260.6 2.4 0.0019 708 2.0 262.6 2.4 534.9 0.0160 0.0019 709 1.5 264.1 2.4 533.0 0.0161 0.0019 710 1.2 265.3 2.4 530.6 0.0162 0.0018 711 0.9 266.2 2.4 527.6 0.0163 0.0018 712 0.8 267.0 2.4 524.5 0.0163 0.0018 523.3 713 1.8 268.8 2.4 0.0164 0.0018 714 3.0 271.8 2.4 524.5 0.0166 0.0018 715 3.6 275.4 2.4 526.9 0.0168 0.0018 716 279.1 2.4 529.3 0.0171 0.0018 3.7

Tabla X.4- Continuación.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Suma intensidad (A)	Valor medio intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
717	3.4	282.5	2.4	531.2	0.0173	0.0018
718	3.0	285.5	2.4	532.3	0.0174	0.0019
719	2.4	287.9	2.4	532.3	0.0176	0.0019
720	2.0	289.9	2.4	531.5	0.0177	0.0018

Tabla X.4- Continuación.

Tabla X.5- Determinación del coste de la energía consumida por el generador de nitrógeno 3848 NitroFlow Lab durante la reacción.

Tiempo (s)	Intensidad (A)	Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
0	4.3	860	0	
2100	4.5	990	0.57750	0.0034
3000	4.5	990	0.24750	0.0034

Tabla X.6- Determinación del coste de la energía consumida por el reactor de altas prestaciones Parr 5101 y la bomba de vacío de KNF durante la reacción.

Intensidad (A) Potencia (W)	Energía (kWh)	Coste (€/min)
0.3	66	0.07	0.0002

Cálculo del coste de los sustratos.

Tabla X.7- Determinación del coste de los sustratos necesarios para sintetizar 20 g de producto con unas proporciones de cada éster similares a las del espermaceti.

Sustrato	Precio (€/kg)	Cantidad (g)	Coste (€)
Ácido láurico	42	1.5138	0.0636
Ácido mirístico	37.4	3.734	0.1397
Ácido palmítico	42	3.8349	0.1611
Ácido esteárico	42	0.8074	0.0339
Alcohol cetílico	41.7	10.1099	0.4216
Coste total (€)			0.8198

Determinación del coste del proceso de síntesis enzimática de espermaceti utilizando biocatalizadores comerciales.

Tabla X.8- Determinación del coste de la síntesis sin tener en cuenta la posibilidad de reutilizar los derivados inmovilizados comerciales.

Biocatalizador	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
Tiempo para conversión del 98% (min)	52.61	50.91	61.17	102.43
Cantidad de biocatalizador empleado (g)	0.5	0.5	0.5	1
Precio del biocatalizador (€/kg)	1600	1300	600	70
Coste del biocatalizador (€)	0.8000	0.6500	0.3000	0.0700
Coste de los sustratos (€)	0.8198	0.8198	0.8198	0.8198
Coste del Calentamiento* (€)	0.0650	0.0650	0.0650	0.0650
Coste de operación reactor y bomba de vacío (€)	0.0105	0.0102	0.0122	0.0205
Coste generación de N ₂ * (€)	0.1190	0.1190	0.1190	0.1700
Coste total del proceso (€)	1.9090	1.7556	1.4261	1.3296

* Engloban el coste calentamiento/la generación inicial y el coste derivado de la síntesis.

Biocatalizador	CalB immo Plus	Novozym [®] 435	Lipozyme [®] RM IM	Lipozyme [®] TL IM
Tiempo para conversión del 98% (min)	52.61	50.91	61.17	102.43
Cantidad de biocatalizador empleado (g)	0.5	0.5	0.5	1
Número de reutilizaciones	15	15	15	15
Precio del biocatalizador (€/kg)	1600	1300	600	70
Coste del biocatalizador (€)	0.0533	0.0433	0.0200	0.0047
Coste de los sustratos (€)	0.8198	0.8198	0.8198	0.8198
Coste del Calentamiento* (€)	0.1597	0.1566	0.1751	0.2494
Coste de operación reactor y bomba de vacío (€)	0.0105	0.0102	0.0122	0.0205
Coste generación de N ₂ * (€)	0.1190	0.1190	0.1190	0.1700
Coste total del proceso (€)	1.1623	1.1489	1.1461	1.2643

Tabla X.9- Determinación del coste de la síntesis teniendo en cuenta las reutilizaciones viables de los derivados inmovilizados comerciales.

* Engloban el coste calentamiento/la generación inicial y el coste derivado de la síntesis.

Determinación del coste del proceso de síntesis enzimática de espermaceti utilizando derivado inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L.

Tabla X.10- Determinación del coste de inmovilización de Lipozyme[®] CALB L sobre los diferentes soportes estudiados.

Soporte	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
Cantidad soporte (g)	10	10	10	10	10
Precio soporte (€/kg)	254	202	572	572	1120
Coste soporte (€)	2.54	2.02	5.72	5.72	11.2
Cantidad de Lipozyme [®] CALB L (mL)	25	25	25	25	25
Precio Lipozyme [®] CALB L (€/L)	96	96	96	96	96
Coste Lipozyme [®] CALB L (€)	2.40	2.40	2.40	2.40	2.40
Cantidad etanol (mL)	10	10	10	10	0
Precio etanol (€/L)	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4
Coste etanol (€)	0.224	0.224	0.224	0.224	0
Cantidad tampón fosfato (mL)	125	125	125	125	125
Precio tampón fosfato (€/mL)	0.00104	0.00104	0.00104	0.00104	0.00104
Coste tampón fosfato (€)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Coste energético activación (€)	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072
Coste energético inmovilización (€)	6.788	6.788	6.788	6.788	6.788
Cantidad derivado seco obtenido (g)	4.79	4.47	3.95	5.06	3.37
Coste total (€/g)	2.4954	2.5577	3.8311	2.9907	6.1099

Biocatalizador	Lewatit	Amberlite	ECR 1090 M	ECR 8806 M	ECR 8285 M
Tiempo para conversión del 98% (min)	77.52	57.01	68.43	60.14	55.57
Cantidad de biocatalizador empleado (g)	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25
Número de reutilizaciones	5	15	3	15	10
Precio del biocatalizador (€/g)	2.537	2.603	3.882	3.031	6.110
Coste del biocatalizador (€)	0.2537	0.0868	0.3235	0.0505	0.1528
Coste de los sustratos (€)	0.8198	0.8198	0.8198	0.8198	0.8198
Coste del calentamiento* (€)	0.2045	0.1676	0.1882	0.1733	0.1650
Coste de operación reactor y bomba de vacío (€)	0.0155	0.0114	0.0137	0.0120	0.0111
Coste generación de N ₂ * (€)	0.17	0.119	0.119	0.119	0.119
Coste total del proceso (€)	1.4635	1.2046	1.4642	1.1746	1.2677

Tabla X.11- Determinación del coste de la síntesis teniendo en cuenta las reutilizaciones viables de los derivados inmovilizados de Lipozyme[®] CALB L.

* Engloban el coste calentamiento/la generación inicial y el coste derivado de la síntesis.



8. Summary

8. Summary.

8.1. Introduction.

The aim of this Doctoral Thesis is the comparative study of the solvent-free synthesis of a mixture of esters similar to natural spermaceti by using different immobilised lipases, both from commercial origin or *in-situ* elaborated.

8.1.1. Spermaceti.

The spermaceti is a wax rich in esters with a high molecular weight, that is produced in the head cavity of the sperm whale (*Physeter macrocephalus* or *Physeter catodon* [1,2]). At physiological temperature, the spermaceti flows as a clear fluid in the spermaceti organ, or "case", and the "junk" of these cetaceans. The case is a spongy barrel-shaped organ situated above the junk, which is divided into compartments by transverse septa of denser tissue [3,4]. For many years, these organs were believed to have a key role in the control of the buoyancy of sperm wales [5], but nowadays, the most accepted theory is that they have a sound transmission function, allowing the production of the clicks used as a biosonar and suited for communication applications [6–8].

Sperm whales had been one of the most persecuted cetaceans in history, due to the fact that the spermaceti has been a valued raw material in candle-making, pharmaceutical, cosmetic and lubricants industry. Specifically, they had been subject to two large-scale periods of hunting. The "open-boat" or "traditional" whaling period started in 1712 and lasted until the beginning of the 20th century, while the "modern" and engine-powered whaling industry, which began in the 1950s, finished effectively in 1988 due to the International Whaling Commission's moratorium on commercial whaling that was established after the alarming decline of whales' populations during the previous decades [9].

The sperm whale is currently protected by the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, which bans international trade in any part or derivative of endangered species for commercial purposes [9–12]. Unfortunately, while sperm whale's number was expected to recover worldwide after removing their main threat, there is little clear evidence of regrowth of its population. This might be caused by the virtual elimination of large breeding males, the anthropogenic disruption of their habitat and the worrying pollution of the oceans [9,11,13–16].

At present, synthetic spermaceti is still used, mainly in cosmetic industry as a hardconsistency emollient. It can be found in a wide variety of cosmetic products like creams, lotions, lipsticks or powdered make-up, where it is chiefly employed as a protective, excipient and/or structural agent. In addition, it can be used to confer opacity and brightness and regulate the hardness and melting point of cosmetic formulations [17,18]. Spermaceti is also found in pharmacy because of its similarity to human's skin sebum and its emollient properties. The spermaceti is usually part of topic medicines, such as creams for damaged skin surfaces, and it can be employed as a slow drug dispenser in the production of tablets and suppositories [19–22]. It also can be found in lubricants and image industry [23–28].

Because of its industrial interest, many studies can be found in the literature tackling the chemical characterisation of natural spermaceti, but due to its animal origin, its composition may differ depending on the sex, age and habitat of the specimen [3]. Despite this, most authors agree on the fact that around 90 - 95% of spermaceti is esters, mainly cetyl myristate $(C_{30}H_{60}O_2)$ and cetyl palmitate $(C_{32}H_{64}O_2)$ with lower proportions of cetyl laurate $(C_{28}H_{56}O_2)$ and cetyl stearate $(C_{34}H_{68}O_2)$. Next fraction in importance (5%) is composed above all of triglycerides of the myristic and palmitic acid, while a 2% of the spermaceti is free fatty alcohols (mostly cetyl and stearic) and acids (myristic and palmitic). Traces of C14 to C18 hydrocarbons (0.1%) have been detected too [29–33].

Due to spermaceti's chemical complexity, the centesimal composition established by M. Wellendorf [29] will be used as a major reference during this Doctoral Thesis:

- Cetyl laurate: 15% (w/w)
- Cetyl myristate: 37% (w/w)
- Cetyl palmitate: 38% (w/w)
- Cetyl stearate: 8% (w/w)
- Others: 2% (w/w).

The physicochemical properties of the spermaceti are a consequence of its high content in long-chained esters with a minimum percentage of triglycerides. As previously mentioned, the spermaceti is crystalline bright white solid at room temperature. It has a greasy texture and the consistency of a hard wax. It is soluble in ethyl ether, chloroform and hexane, and also in ethanol and acetone when heated.

Concerning spermaceti's main components, they are predominantly used in cosmetic and pharmaceutical industry. In pharmacy, they can be found as part of the treatments for healing eczema, psoriasis or arthritis, and they are also employed as an excipient and vehicle for active principles [34–36]. In cosmetics, they act as skin conditioner, shampoo surfactants, emulsifiers, emollients and structural agents in creams, lotions and makeup [37,38].

8.1.2. The cosmetic industry.

8.1.2.1. The cosmetic sector's actual situation.

The search of beauty by means of cosmetics is as ancient as the same humanity. Nevertheless, relating the term "cosmetic" only with make-ups is completely wrong, because, actually, this word makes reference to a wide range of products involved in everyday hygiene, health and aesthetics. Everyone is a potential user of cosmetic and personal care products, independently of his age, sex, origins or profession, so the cosmetic industry is a multidisciplinary, highly innovative and science-driven sector. Every year, the multinational cosmetic corporations reformulate between 25 and 30% of their products, which implies large investments in research and development. For instance, the total expenditure on R&D in Europe in 2014 was estimated in 1270 million and, among the 179000 direct employments generated by the cosmetic sector, 26000 were scientific positions [39].

In order to satisfy consumers' needs, a huge diversity of product forms (suspensions, powders, gels, pastes, emulsions, etc.) is available under different formats, such as sprays, roll-on, sticks or wipes. As a consequence of this variety, there are many criteria to classify personal care products, but the most commonly used is their classification according to their function: perfumes and fragrances, decorative cosmetics, hair care products, skin care products and toiletries [39]. Cosmetics are distributed to consumers through different channels and almost 50% of sales are made in supermarkets and department stores, followed by pharmacies (22%) and specialised shops (21%) [40].

Europe is the largest market for cosmetics in the world and it has been valued in 77000 million. It is followed by the USA (64000 million of euros), China (41000 million) and Brazil and Japan (~20000 million). While there are more than 5000 manufacturers of cosmetics in Europe, the vast majority (4900) are small and medium enterprises and the internal trade of cosmetic ingredients and products within the UE30 is a critical component of the industry, exceeding 33000 million during 2016 [39].

In spite of the economic crisis, the production and commercialization of personal care products is still one of the major sectors in Spain's economy. The Spanish market of cosmetic products was estimated in 6657 million during 2016, being the 5th main producer in Europe after Germany, the UK, France and Italy. Spaniards spend in personal care products ~144 \in per year and habitant, more than the European average [39,40].

The cosmetic sector is one of the industrial activities that may be controlled to prevent risking human health. The fundamental pillar of the legal framework on cosmetics products in Europe is the Regulation (EC) n° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of

30 November 2009, which came into effect on 11 July 2013. All over the EU, this regulation introduces the figure of a responsible person that shall ensure the cosmetic compliance with the legal requirements. It also bans animal testing, makes some restrictions for substances to be used in cosmetic formulations and standardise the labelling of cosmetic products.

It also defines a cosmetic product as:

"any substance or mixture intended to be placed in contact with the external parts of the human body (epidermis, hair system, nails, lips and external genital organs) or with the teeth and the mucous membranes of the oral cavity with a view exclusively or mainly to cleaning them, perfuming them, changing their appearance protecting them, keeping them in good condition or correcting body odours" [41].

However, nothing is mentioned in that regulation about natural cosmetic. While defining a new regulation (ISO 16128), the European Commission has accepted the definition approved by the Committee of Experts on Cosmetic Products, that determines that natural cosmetic products should be prepared with natural ingredients of vegetal, animal or mineral origin obtained by physical methods (pressing, extraction, filtration, distillation or drying), microbiological or enzymatic. Consequently, independent certification organizations accept labelling as "natural" substances from biotechnological origin if no genetically modified organisms traces can be detected [42–44].

8.1.2.2. Emollients role in cosmetic science.

As previously mentioned, cosmetic industry is worth in more than 220000 million of euros in 2016, and most of its benefits are due to the production and commercialisation of skin care products [39].

Emulsions are the most popular cosmetic form among facial and body care products. Emulsions are a mixture of two or more immiscible substances that must be stabilised against separation by emulsifiers as they are thermodynamically unstable systems. They may be formulated of oil in water (O/W), water in oil (W/O) and silicone in water but there is a growing interest in multiple emulsions, such as water-in-oil-in-water (W/O/W) or oil-in-water-in-oil (O/W/O) ones. Besides, when the viscosity of the emulsion is so low that it flows and pours, the product is called a lotion or milk, but when the preparation is semisolid it is referred as a cream [45,46].

The ingredients composition, type of emulsion, droplet size, viscosity and pH of the cosmetic preparation are key aspect to be considered before formulating skin care products, as they will condition the stability, properties and effect of an emulsion [45–48]. As important as the cosmetic fulfills its functions effectively, is that users have a pleasant experience during the use of the product, since this is a determining factor in ensuring customers' loyalty. As a result, in the last decades more and more experts are trying to understand which products' physicochemical characteristics are the responsible for the sensory texture properties experienced while using it. Consequently, there are more and more publications relating the

result of sensory evaluation of emulsions carried out by trained panels with data collected from rheology, texture and microstructure studies. One interesting aspect is that this kind of research could be performed in order to determine the properties of the entire cream or to evaluate the influence of a specific ingredient in the whole formulation. This is particularly convenient for emollient effect determination [49–55].

An emollient is a substance that softens and protects the skin and the mucosae and reduces its inflammation. While humectants like glycerine and propylene glycol are hygroscopic ingredients that attract and retain humidity into the skin, emollients create an occlusive barrier on the stratum corneum that avoids water evaporation and the itching of the dry skin. The use of emollients prevents from the action of allergens, irritants and bacteria and reduces the risk of suffering from eczema. In addition, emollients can be used as excipients for active principles or insoluble compounds like some pigments. Thus, not only can they be found in creams, but also in sunscreens, facial cleaners, shampoo or lipsticks, among others [45,56,57].

Emollients are generally the main constituent of skin care emulsions if water is not considered, with a concentration comprised between 3 and 20% (w/w). The kind and quantity of emollient that are used in a cosmetic formulation depends on its compatibility with the rest of the ingredients, on the emulsion's stability and on the softness that is expected to be provided to the skin. Chemically, triglycerides, hydrocarbons, silicone derivatives, ethers and fatty alcohols might have emollient properties, but esters are the most popular among them due to their versatility, applicability and the possibility of extraction from natural sources [49,50,56,58].

Emollient esters are fat-soluble substances, so they are found in the oil phase of emulsions. Cream's viscosity depends on ester's chemical structure and usually is higher as molecular of weight of the ester rises. Increasing viscosity has also been related to the presence of some functional groups, like hydroxyl substituents, that allows the interaction with more polar molecules within the emulsion. Generally, cream's extensibility is oppositely related to viscosity. For example, ramified esters are easier to spread, but this feature is lower as molecular weight increases [45].

On the other hand, the ester's melting point will be higher as carbon chain length is bigger, which is connected to emulsions consistency and thermal resistance. Some others aspects worth of study are angle of contact, interfacial tension and polarity of the ester, as this parameters are also related to the cream's extensibility, difficulty for the emulsification and transdermal permeability [49,50,58].

Regarding sensory properties, it has been observed that a simple monoester of a short fatty acid or alcohol will possess a light feel. Branched ester will feel nongreasy, and more complex esters will have a "cushiony feel" [45].

8.1.3. Industrial biocatalysis.

The use of biotechnological processes at industrial scale, or white biotechnology, is a promising tool to replace conventional synthesis processes. Its several benefits are a consequence of the intrinsic properties of cells and enzymes, and biocatalysis has demonstrated to be an efficient and eco-friendly technology enabling the chemical industry to address the challenges of sustainability while following the "12 principles of Green Chemistry" [59,60].

Nonetheless, there are still many prejudices about biocatalysis in our days. One of them is that enzymes only feature limited substrate specificity, what is partially inaccurate, as ordinary-sized enzymes have broad substrate specificity in most cases, and almost all the spectra of organic chemistry reactions can be carried out by means of enzymes [61].

Enzymes are usually said to be restricted to uses under physiological conditions, what it might be one of its major points and drawbacks simultaneously. Anyway, applications at high temperatures and pressures, in non-conventional media (organic solvents, supercritical fluids or ionic liquids) or even in solvent-free media have been performed successfully [62–66].

Furthermore, enzymes are able to reach high reaction rates, and they are extraordinarily selective catalysts, showing a chemo, regio and enantioselectivity that makes them especially suited for fine chemistry [67]. Due to this good selectivity and their mild reaction condition requirements, biocatalysts are a clean, environmentally friendly technology which contributes to the reduction of greenhouse gases, low industrial waste generation and low energy consumption, as it has been demonstrated by Life Cycle Assessment [68].

Despite its several benefits, the implementation of white biotechnology within the industrial productive processes is not a common reality. This is essentially due to the relatively high cost of biocatalysts, which can be reduced by immobilising enzymes on a carrier, as this would enable the recovery and reuse of the biocatalyst. The use of immobilised derivatives implies an easier reactor design, which can be a fluidised-bed, a fixed-bed or a stirred tank in batch or continuous operation [69].

Enzyme immobilisation onto carriers implies the formation of chemical bonds between them, so enzymes' activity may be modified (reduced in most cases) while immobilising. In one hand, adsorption is an easy technique that allows the binding of a quite high amount of enzyme. It usually implies the formation of weak bonds, such as Van der Waals, ionic forces or hydrogen bonding. As a consequence, enzymes' activity is not seriously affected, but desorption from the carrier may occur even with minor changes in pH, substrate concentration or solvent. Most of enzymes are better adsorbed onto hydrophilic supports; however, lipases tend to prefer non-polar carriers due to their remarkable features, as it will be discussed afterwards [67,70].

On the other hand, covalent binding leads to the irreversible formation of stable chemical bonds. Thus, this technique prevents the leakage of the enzyme to reaction media, but it usually entails a loss of enzyme's catalytic activity. The functional groups of the

enzyme which are commonly involved in this kind of binding are nucleophilic, and immobilisation protocols are made up of two steps: an activation of the carrier in order to introduce a "spacer" that protects and makes more accessible the enzyme and then, the enzyme's immobilisation in itself. Among the different methods for covalent binding, only the ones implying a preactivation with glutaraldehyde or epoxy resins have had industrial success [67,70].

This work is only focused on lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3), enzymes implied in the digestion and processing of lipids [71]. Although their natural role is to hydrolyse triglycerides, under certain conditions such as low water concentration in reaction media, lipases are able to catalyse esterification, interesterification, alcoholysis, acidolysis and aminolysis reactions [72–75].

X-ray crystallography has proven that all lipases show the α/β hydrolase fold. The catalytic triad of lipases is composed by serine (Ser), histidine (His) and aspartic acid (Asp), even though sometimes the last one is substituted by glutamic acid (Glu). Lipases are widely found in nature and do not require cofactors. Their mechanism of action is similar to the one employed by esterases and consists in the formation of two tetrahedral intermediates. The first one is due to the nucleophilic attack of the catalytic serine and it is stabilised by hydrogen binding in a region called the "oxyanion hole". Then, the alcohol is released and a covalent complex is formed between the enzyme and the acyl radical and a second tetrahedral intermediate is formed after a new nucleophile attack. Finally, the intermediate collapses and the product and the free enzyme are liberated. Nevertheless, lipases and esterases are distinguished by their substrate specificity: lipases are lipolytic enzymes and therefore accept medium or long-chain fatty acids as substrate, whereas esterases prefer short acids. According to Pleiss et al., this might be caused by the depth of the binding site between the enzyme and the acyl moiety [76,77].

Unlike estearases, which follows Michaelis-Menten kinetics, lipases show low reaction rates when their substrate is dissolved in a monomeric state, but their activity is radically enhanced when lipid-water interfaces are formed [67]. This has been called "interfacial activation" and it has been associated to the fact that lipases' active site is partially or totally covered by one of its α helix, the "lid". When the enzyme contacts the interface between water and oil, the lid is folded back making the active site accessible for substrates (open conformation). However, the presence of the lid does not completely explain interfacial activation of lipases, and this phenomenon might be a consequence not only of the structural changes in lipases when placed in biphasic systems, but also of the conformation of the lipids in the reaction media and the interaction between them [71,78].

Another remarkable characteristic of lipases is that they possess a higher proportion of hydrophobic surfaces than other enzymes. Those areas are polarized in the active site region so that the available lipophilic surface is reduced when the lipase is in its closed form [76,79].

Lipases are also more stable and active in non-aqueous systems, but the presence of water must be taken into account when operating in organic media, as some is needed for maintaining the protein's ionisation and structural flexibility and ensure its activity, but an excess eases thermal deactivation processes and complicates substrates diffusion in the organic phase. Moreover, during esterification and transesterification processes water shifts chemical equilibrium unfavourably and may act as a competing inhibitor [80,81].

Among the different existing enzymes, lipases are one of the most used for industrial purposes. In this sense, their application in industries such as the textile [68,82], paper [68,83,84], biodiesel [85,86], food [87,88], pharmaceutical [89,90] and cosmetic [91,92] has been described.

The lipases studied during this work are the ones mentioned below.

• Candida antarctica lipase B (CalB)

The yeast *Candida antarctica* produces two different isoenzymes named lipase A and B. While *Candida antarctica* lipase A is a very thermostable enzyme and non-specific in its real application, lipase B is a robust enzyme which has a high regio and enantioselectivity both in hydrolytic or synthetic purposes [93].

CalB is composed by 317 amino acids and its molecular weight is of 33 kDa. It is a globular enzyme with approximate dimensions of 30x40x50 Å. It has an isoelectric point of 6 but CalB is stable at a pH range from 3.5 to 9.5, and its denaturalisation temperature at free state in aqueous media is comprised between 50 and 60 °C [94,95].

CalB does not exhibit interfacial activation; the catalytic triad is made up of Ser105-His224-Asp187 and is barely covered by a short α helix. The active site pocket is composed of two narrow channels, being the one hosting the acyl moiety more spacious than the one containing the alcohol, which determines its selectivity [95,96].

• *Rhizomucor miehei* lipase (Rml)

This lipase is an extracellular protein from the fungi *Rhizomucor miehei*. Its molecular weight is 31.6 kDa and its isoelectric point of 3.8. Rml is formed by a single chain of 269 amino acids that folds into a singly wound β sheet domain. As all the loops that connect the parallel strands are right-handed, this is an asymmetric sheet, which is quite uncommon.

The binding pocket of Rml is wider than long, so it accepts larger acids and more kind of alcohols than CalB. Its catalytic triad is composed by Ser144-His257-Asp203 and is covered by an amphipathic α helix. Rml shows interfacial activation and tends to create bimolecular aggregates in its open form.

Several studies have found that Rml is especially stable in low water activity system. In addition, it has been pointed out that pressurization helps to prevent its thermal deactivation, so Rml might be an interesting enzyme to be used when working with supercritical fluids [77,97–99].

• *Thermomyces lanuginosus* lipase (Tll)

Thermomyces lanuginosus is another lipase from fungi origin. It has a quite spherical shape (35x45x50 Å) and it has a molecular weight of 31.7 kDa, an isoelectric point of 4.4 and an optimum pH of 9. Free Tll is quite stable, as it maintains its activity between 55 and 60 °C.

As Rml, Tll is composed by a single polypeptide chain of 269 residues, but it contains a central eight-stranded, predominantly parallel β sheet structure, with five interconnecting α helices. The binding centre of this lipase is composed by Ser146-His258-Asp201 and is more spaced to accommodate alcohols than acids. Tll suffers from interfacial activation; its lid has a great mobility, which contributes to ease the formation of aggregates [79,98,100].

8.2. Materials and methods.

8.2.1. Materials.

8.2.1.1. Biocatalysts.

During this work, nine different immobilised derivatives had been tested:

- CalB immo Plus was purchased from c-LEcta GmbH and Purolite Corporation. It is prepared by adsorption of CalB on the DVB/methacrylate Purolite's carrier ECR 1030 M (9550 ± 500 PLU/g).
- Novozym[®] 435 is made of the CalB immobilized by adsorption onto the macroporous DVB/methacrylate co-polymer resin Lewatit[®] VP OC 1600. Its declared activity is 10000 PLU/g, where one unit corresponds to the synthesis of 1 µmol per minute propyl laureate from lauric acid and 1-propanol.
- Lipozyme[®] RM IM is a Rml biocatalyst prepared by immobilizing on the weak anionic exchange resin Duolite ES 562 (phenol-formaldehyde copolymers), with a declared activity of 275 IUN/g (interesterification units).
- Lipozyme[®] TL IM is an immobilized derivative of Tll on a cationic silicate (250 UIN/g).

The rest of the biocatalyst have been prepared by immobilising Lipozyme[®] CALB L, a commercial solution of CalB (\geq 5000 LU/g by tributyrin assay), onto the five different carriers described in Table 8.1.

Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM, Lipozyme[®] TL IM and Lipozyme[®] CALB L were kindly donated by Novozymes Spain S.A.

Table 8.1- Propert	ies of the carriers employed f	for immobilisation	<i>ı</i> .			
Carrier	Matrix	Kind	Surface area (m²/g)	Pore diameter (Å)	Particle size (μm)	Humidity (%)
Lewatit [®] VP OC 1064 MD PH (Fluka)	polystyrene	hydrophobic	800	50 - 100	440 - 540	50 - 60
Amberlite TM XAD TM 1180 (Acros Organics)	polystyrene/DVB	hydrophobic	≥450	300 - 400	350 - 600	61 - 67
Purolite [®] Lifetech TM ECR 1090 M (Purolite Ltd.)	polystyrene/DVB	hydrophobic	>750	900 - 1100	300 - 710	67 - 73
Purolite [®] Lifetech TM ECR 8806 M (Purolite Ltd.)	octadecyl methacrylate	hydrophobic	>80	500 - 700	300 - 710	58 - 63
Purolite [®] Lifetech TM ECR 8285 M (Purolite Ltd.)	epoxy/butyl methacrylate	epoxy resin	1	400 - 700	100 - 710	70 - 80

8.2.1.2. Reagents.

In order to perform the experimental work some different substrates were needed. Lauric acid (99 %) was acquired from Acros Organics. Myristic acid (98 %), palmitic acid (98 %), stearic acid (95 %) and cetyl alcohol were all from Sigma-Aldrich. All other chemicals were analytical reagent grade.

8.2.1.3. Cosmetic ingredients.

Different oil-in-water emulsions were made by mixing the cetyl esters and the spermaceti with the following cosmetic grade ingredients: DUB 340 (Stéarinerie Dubois), DUB 810C (Stéarinerie Dubois), Arlamol HD (Croda), glycerin (Aroma-Zone), Ultrez 10 (Lubrizol) and Isocide SMM (Biophil).

8.2.1.4. Equipment.

The main equipment required to carry out the experimental work is listed below:

- Orbital agitator from Infors HT.
- Jacketed column reactor (30 cm long, diameter of 2.5 cm, sintered glass plate placed 5 cm from the bottom), from Afora.
- Cryostat with Haake DC30 controller, from Thermo Scientific Corporation.
- Watson Marlow peristaltic pumps, model 505 Du.
- Open-air 250 mL batch reactor (Afora).
- Vertical stirrers RW 11 Basic, from IKA[®].
- High performance batch reactor 5101 model (Parr 5100 series), Parr Instruments Co. Its reaction vessel is round-bottomed, glass jacketed and has a total volume of 100 mL. The reactor is equipped with a four-bladed impeller and allows working under low pressure and inert atmosphere conditions.
- Autonomous nitrogen generator 3848 NitroFlow Lab (Parker).
- Vacuum pump KNF N816.3.KN18, from KNF.
- Turbotest mixer for cosmetic purposes, from VMI Rayneri.
- ULTRA-TURRAX[®] digital T 25 (IKA[®]).
- UV/visible spectrophotometer Evolution 300, from Thermo Scientific Corporation.

- Coulometric Karl Fischer titrator model 899 equipped with the oven 860 KF Thermoprep, both from Metrohm.
- HPLC consisting in a modular system from Waters, with a 717 plus automatic injector and a 600 E quaternary-gradient pump. The system is equipped with a 2996 photodiode array detector and a XBridge C18 column (4.6 mm x 150 mm).
- Light microscope Leica DMLP equipped with a camera and the software Leica IM 1000 (Leica Microsystems AG).
- Differential scanning calorimeter Pyris 1, from PerkinElmer, with an intracooler IIP.
- Texture analyser TA.XT Plus (Stable Micro Systems) equipped with a cylindrical probe P/0.5R, a Peltier cabinet XT/PC, a A/FR (ASTM-D 1894-90) plate and a mobile sled with a Helioplate[™] HD 2 (from Helioscreen).
- SALD-7500nano laser diffraction granulometer with a quartz sampling batch cell SALD-BC75, both from Shimadzu.

8.2.2. Methods.

8.2.2.1. Enzyme immobilisation.

The procedure for immobilising CalB by absorption into Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M and ECR 8806 M carriers, started mixing 5 g of support with a 50 mL of a 10% (v/v) solution of ethanol in water. This was stirred at 120 rpm in an orbital shaker for 12 h. Then, the activated support was washed twice with 25 mL of deionized water and was transferred to a jacketed column reactor. Once washed, 25 mL of Lipozyme[®] CALB L solution in phosphate buffer 0.1 M, pH 7 (50% v/v) were added and recirculated for 72 h at 4 °C. The supernatant solution was recovered and the immobilized derivative was rinsed with 2 x 25 mL of phosphate buffer 0.1 M, pH 7, in order to remove loosely-bound enzyme. Finally, the biocatalyst was air dried.

Covalent immobilisation protocol for ECR 8285 M support starts with a rinsing of 0.5 g of the carrier with phosphate buffer (1 M, pH 7) in an orbital shaker set at 120 rpm. Then, the support is introduced in the jacketed column reactor and a 50% (v/v) Lipozyme[®] CALB L solution in phosphate buffer 1 M, pH 7 and is recirculated for 72 h at 9 °C. Once the immobilisation is finished, the supernatant is recovered and the biocatalyst is washed with 0.1 M phosphate buffer at pH 7. In order to ensure the desorption of the lipase which has not been immobilized by covalent bond, a second wash is carried out with a solution of phosphate buffer (0.1 M, pH 7) containing sodium chloride at a concentration of 0.5 M.

The immobilised derivatives were stored at 7 °C until use. The amount of immobilized protein was determined by Lowry's method from the difference between the protein available in the enzymatic solution and that one present in the supernatant and buffer washings [101].

8.2.2.2. Solvent-free synthesis of the cetyl esters.

All reactions were carried out in a solvent-free medium containing 20 g of substrates, in a molar ratio or in the same proportions than natural spermaceti. The substrates were melted before adding the biocatalyst. Previous experiments were carried out at atmospheric pressure in the open-air jacketed reactors while the optimization experiments were performed within 6 h in Parr 5101 high performance reactor with a continuous dry N_2 input (54 L/h) at 160 mmHg.

The reuse of the biocatalyst was studied by recycling the immobilised derivative several times after one hour of use. For that purpose, the bulk of the product was removed and the biocatalysts were recovered by rinsing two or three times with 10 mL of acetone or hexane, filtering and air drying before using them in another batch, with new fresh reagents.

8.2.2.3. Acid value determination.

The acid value (A.V.) is defined as the amount of KOH (in milligrams) necessary to neutralize the free carboxyl groups present in 1 g of sample [102].

Conversion (*x*) can be defined based in A.V. measurements as:

$$x = \frac{A.V_{\cdot 0} - A.V_{\cdot t}}{A.V_{\cdot 0}}$$

Where $A.V_{.0}$ and $A.V_{.t}$ are the acid values at the beginning of the reaction and at a given time during it, respectively.

8.2.2.4. Hydroxyl value measurement.

The hydroxyl value is defined as the milligrams of potassium hydroxide used to neutralize the acetic acid remaining when the hydroxyl groups contained in 1 g of sample are acetylated [103].

8.2.2.5. Saponification value determination.

The saponification value represents the milligrams of potassium hydroxide needed to saponify all the free and esterified fatty acids in 1 g of sample [104].

8.2.2.6. Iodine value measurement.

The iodine value is used to determine the grade of unsaturation of a substance, and it corresponds to the grams of iodine consumed per 100 g of sample [105].

8.2.2.7. Water content determination.

The amount of water contained in 1 g of sample was determined by culombimetry after heating the sample at 110 °C.

8.2.2.8. HPLC analysis.

High performance liquid chromatography (HPLC) was performed in an isocratic elution; at 35 °C using a mobile phase of acetonitrile/acetone (75/25 v/v) at a flow rate of 2 mL/min. Samples were prepared with a concentration of 10 or 20 mg/mL.

8.2.2.9. Formulation process of the emulsions.

Seven oil-in-water emulsions, as 200 g of typical cosmetic creams, were prepared by varying the oil phase composition to include cetyl laurate, myristate, palmitate and stearate and spermaceti in the formulation (Table 8.2). In addition, an O/W cosmetic emulsion with no enzymatic ester was made as a standard [50]. Each cream was obtained by following the same steps. The ingredients of the oil phase (A) were mixed at 75 °C under stirring, while the carbomer (Phase B) was slowly sprinkled in the mix of purified water and glycerine and left to stand at ambient temperature for 20 minutes. Once this time had come to an end, the aqueous phase (B) was heated to 75 °C. When both phases had reached this temperature, the water loss by evaporation in the aqueous phase was compensated. Immediately after, the oil phase (A) was added to the aqueous one (B) under mechanical stirring at 11000 rpm for 1.5 min with an Ultra-Turrax equipped with a S25N-25F rotor-stator turbine. Then, the emulsion was kept under stirring in a Turbotest at 350 rpm until its temperature was under 50 °C. At that moment, a 10% aqueous NaOH solution was added in a sufficient quantity to reach a pH between 6.2 and 6.5. As the emulsion became thicker, the stirring speed was increased to 500-600 rpm and a preservative (C) was incorporated to the emulsion when it was cooled under 40 °C.

Dhaga	In an aliant	INCI name	Free off or	Content (% w/w)	
Phase	Ingrealent	INCI name	Function	Standard emulsion	Test emulsion
	DUB 340	cetyl alcohol, glyceryl stearate, PEG-75 stearate, ceteth-20, steareth-20	emulsifier	5	5
А	DUB 810C	coco caprylate/caprate	emollient	14	7
(oil)	Arlamol HD	isohexadecane	emollient	8	4
	Cetyl ester or spermaceti		emollient	0	11
-	Water	aqua		66.7	66.7
B (aqueous -)	Glycerine	glycerin	humectant	5	5
	Ultrez 10	carbomer	gelling agent	0.3	0.3
	NaOH 10%	sodium hydroxide	pH regulator	рН 6.2 – 6.5	рН 6.2 – 6.5
С	Isocide SMM	propylene glicol, methylpropanediol, postassium sorbate, methylisothiazolinone	preservative	1	1

Table 8.2- Composition of the O/W emulsions.

8.2.2.10. Microscopy.

All the creams were observed with optical microscopy at room temperature one, six and nine days after its preparation by means of the light microscope Leica DMLP in transmission mode.

8.2.2.11. Differential scanning calorimetry.

Ingredients (the four cetyl esters, spermaceti and emulsifier), the oil phases (with and without the emulsifying agent) and the cosmetic emulsions were analysed with the differential scanning calorimeter Pyris 1. For that purpose, a fixed amount of sample (~10 mg for the enzymatic compounds or the oil phases, and ~30 mg for the emulsions) was introduced in a hermetically sealed aluminium sample pan at room temperature. The reference cell (air) and the samples were placed in the head of the calorimeter and hold at 0 °C for one minute before starting to heat from 0 °C to 90 °C at a heating rate of 10 °C/min.

8.2.2.12. Texture analysis.

The texture analyser TA.XT Plus operating in compression/traction mode was used to carry out several penetration tests to the standard emulsion and to the ones containing the cetyl esters and the spermaceti analogue. The texture analyser was equipped with a cylindrical probe P/0.5R, which penetrated the samples to a depth of 15 mm with a predefined rate of 5 mm/s. All the assays were performed under identical conditions but at different controlled temperatures (10, 20, 30, 40 and 50 °C) by using a XT/PC temperature controlled Peltier Cabinet.

To carry out the extensibility tests, the emulsions were delivered on the HelioplateTM HD 2 plate of the mobile device in the form of four parallel 50- μ L lines. Then, the sled was set in the initial position and it was pulled across a polypropylene sheet at a constant speed of 3 mm/s to the distance of 120 mm.

8.2.2.13. Granulometry.

The particle size distribution of the different O/W emulsions was determined by forming a pre-dispersion of the emulsions by gently mixing 0.5 mL of cream in 10 mL of distilled water. This pre-dispersion was added in a sampling cell, previously filled up with water. The amount of pre-dispersion was chosen to obtain an absorption value of 0.20 \pm 0.02. Measurements were performed with a refractive index of 1.45 \pm 0.01i.
8.3. Results and discussion.

8.3.1. Synthesis of spermaceti using commercial biocatalysts.

8.3.1.1. Previous experiments under atmospheric pressure.

In order to check the adequacy of CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM and Lipozyme[®] TL IM for obtaining the spermaceti's esters, the esterification of myristic acid with cetyl alcohol was performed with 1 g of immobilised derivative (IME), at 60 °C and a stirring speed of 350 rpm. These experiments proved the good activity of the commercial biocatalysts for this synthetic purpose.

A desorption test has also been performed. After incubating 0.5 g of biocatalyst for one hour in cetyl alcohol at 70 °C under stirring, no residual synthetic activity was observed in the reaction mixture when the immobilised derivative was removed and myristic acid was added.

Besides, preliminary assays were run comparing the ester synthesis under the same experimental conditions in the atmospheric reactor and the high performance one, as the control of the amount of water in the reaction media is a key aspect to be considered to achieve high conversion values in processes such as esterification. Results proved that for the lowest quantities of biocatalyst tested (0.1 g of Novozym[®] 435), the main advantage of using Parr 5101 reactor lies in the possibility of improving conversion rather than increasing the reaction rate. Nonetheless, improvements in the speed of the process are patent when slightly increasing the amount of immobilised derivative in the reaction media (0.5 g of Novozym[®] 435). Thus, the optimization process was carried out in the high performance reactor, as not only it ensures the efficiency of the synthesis process, but also the reproducibility and repeatability of the results.

8.3.1.2. Optimisation of the synthesis in a high performance reactor.

• Influence of biocatalyst concentration

Being proved that the commercial lipases have the ability to catalyse the esterification of the fatty acids with cetyl alcohol; the reaction rate can be improved by using the right quantity of enzyme. While a too low concentration of enzyme in reaction media can lead to long residence times, excessive amounts of immobilised derivative could difficult mass transfer by creating agglomerations in the reaction media and increase production costs, as biocatalysts are often expensive [106].

The optimization of the biocatalyst concentration was performed for each ester of the spermaceti separately, and reagents were added in equimolecular ratio. The amounts of immobilised derivative tested were comprised between 0.125 and 1 g for the *Candida antarctica* and *Rhizomucor miehei* commercial products, which represents a concentration of

0.625%-5% (w/w) referred to the substrates. A concentration of 10% (2 g) was also assayed for *Thermomyces lanuginosus* biocatalyst. All reactions were conducted at 70 °C, the lowest operation temperature in common for all the substrates, as the highest melting point is ~69 °C for the stearic acid [107].

For all the biocatalyst tested, results were similar to the ones represented for Lipozyme[®] TL IM in Figure 8.1. As it can be noticed, conversion evolves in a nonlinear way during the assay, as it initially increases considerably and then stabilises when reaction's equilibrium is reached.



Figure 8.1- Synthesis of cetyl laurate (a), myristate (b), palmitate (c) and stearate (d) with different quantities of Lipozyme[®] TL IM in a high performance reactor (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h N₂, 160 mmHg).

Table 8.3 gathers the conversion values after 15 and 60 min in the synthesis of cetyl laurate, cetyl myristate, cetyl palmitate and cetyl stearate with Lipozyme[®] TL IM. From a general overview of these data, it is obvious that an increase of the concentration of biocatalyst clearly improves reaction rate until the 2 g assay. Nevertheless, this effect on the kinetics of the process is not clearly proportional to the amount of enzyme present in the reaction medium, as it is demonstrated, for instance, by the analysis of the samples extracted after 15 min of reaction. Moreover, as it can be seen in Table 8.3, it is not noticeable any logical correlation between the conversion calculated based on the analysis of samples withdrawn at other intervals of time, for instance 60 min.

Similar findings are obtained with the other commercial lipase preparations.

	Amount of	Conversion (%)				
	biocatalyst	Cetyl laurate	Cetyl myristate	Cetyl palmitate	Cetyl stearate	
	0.125 g	5.80	3.53	4.15	3.86	
n	0.25 g	7.29	9.03	10.21	6.62	
15 mi	0.5 g	17.04	19.60	19.38	17.85	
	1 g	33.79	41.61	40.49	35.19	
	2 g	71.51	72.35	70.35	64.34	
60 min	0.125 g	15.44	16.91	15.77	13.58	
	0.25 g	29.34	30.12	29.33	28.60	
	0.5 g	61.36	62.74	60.47	61.20	
	1 g	92.84	93.72	91.98	91.58	
	2 g	96.91	96.73	96.07	96.17	

Table 8.3- Conversion at 15 y 60 min during the synthesis of the cetyl esters employing Lipozyme[®] TL IM.

During these assays it has been observed that conversion values achieved by the Tll immobilized derivative are quite lower compared to the other biocatalysts. This might be mainly caused by the hydrophilic character of Lipozyme[®] TL IM's carrier, which is not so suitable for such hydrophobic reagents and products. Similar findings had been described in the literature [108,109].

Regarding Lipozyme[®] RM IM, the biocatalyst exhibited a high activity despite of the non-hydrophobic nature of the resin Duolite ES 562, maybe because Rml tends to catalyse reactions were esters with long acid part are implied [98].

However, highest reaction rates were observed with Novozym[®] 435 and CalB immo Plus. This might be explained by the positive effect of the hydrophobic nature of

the carriers of these commercial products as well as the origin of the lipase, as it has been reported that CalB is very active with a wide variety of esters [95].

In order to study the influence of the chain length of the substrates during the synthesis, reaction rates were calculated for a fixed amount of each immobilized derivative. As a general trend, reaction rate is slower as the carbon chain length increases. This effect is observed for all the immobilized derivatives studied, and varies from a drop of 26.18% for Lipozyme[®] TL IM until 17.98% for Novozym[®] 435. This is only noticeable for the highest quantities of biocatalyst assayed, as the rate determining step might be the mass transfer and diffusion of substrates and products, while for the lowest amounts tested the limiting step may be related to the kinetics of the process. Nevertheless, the effect of the chain length in reaction rate is not relevant in practical terms.

Taking all this considerations into account, the optimum amount of biocatalyst selected for CalB and Rml biocatalysts was 0.5 g (a concentration of 2.5% (w/w) referred to substrates) and 1 g (5% (w/w) of concentration) for the Tll preparation.

• Influence of the temperature

Best reaction temperature was determined by performing assays at 60, 70 and 80 °C with the optimum concentration of biocatalyst selected. There was not apparent denaturation of the enzymes for the range of temperature studied, and the reaction time required to reach the final conversion is slightly shorter as the temperature increases for CalB and Rml biocatalysts. This positive effect might be explained by two main reasons: on one hand, the enhancement of the reaction rate experienced by all kind of chemical reactions when the temperature of the process increases; on the other hand, the reduction of the viscosity of the reaction media with temperature eases mass transfer [82,110]. Despite this, for Tll immobilised derivative increasing of temperature up 70 °C did not improve results, pointing out that this enzyme may be less resistant to temperature. Consequently, 70 °C was selected as the optimum temperature in all cases.

• Biocatalyst reuse

The four commercial derivatives were tried in 15 consecutive batches under the optimum conditions previously determined with success, which proves the excellent operational stability of all the commercial lipase preparations under the experimental conditions.

8.3.2. Immobilisation of Lipozyme® CALB L.

The global results for the immobilisation of Lipozyme[®] CALB L into the resins described in Section 8.2.1.1 are collected it Table 8.4. If compared with methacrylate resin (ECR 8806 M), the results for the polystyrene matrices (Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M) put into evidence the affinity of CalB for this polymer and the importance of a minimum surface area and pore diameter for achieving good immobilisation yields, as it is proved by the fact that immobilisation into Lewatit (the carrier with smaller pore diameter, 50 - 100 Å) was worse than in Amberlite (300 - 400 Å), but not further improvement was observed with ECR 1090 M (900 - 1100 Å).

The covalent immobilisation protocol, applied with ECR 8285 M, led to good outcomes in terms of immobilisation yield and protein loading.

Carrier	Batches per immobilisation	Protein offered (mg)	Dry biocatalyst recovered (g)	Immobilisation yield (%)	Protein loading (mg _p /g)
Lewatit	3 x 5 g	1044.8 ± 69.1	7.18 ± 0.34	49.6 ± 4.3	71.8 ± 3.2
Amberlite	2 x 5 g	717.2 ± 14.6	4.47 ± 0.21	71.9 ± 1.1	115.9 ± 7.0
ECR 1090 M	2 x 5 g	669.3 ± 47.5	3.95 ± 0.02	72.5 ± 3.1	122.9 ± 8.1
ECR 8806 M	2 x 5 g	614.4 ± 6.7	5.06 ± 0.05	69.4 ± 2.0	84.2 ± 2.1
ECR 8285 M	2 x 5 g	604.3 ± 10.4	3.37 ± 0.08	69.3 ± 2.5	124.5 ± 5.0

Table 8.4 – Global results for Lipozyme[®] CALB L immobilisation.

8.3.3. Synthesis of spermaceti using immobilised Lipozyme® CALB L.

8.3.3.1. Previous experiments under atmospheric pressure.

First of all, the activity of Lipozyme[®] CALB L immobilised into the different carriers was tested in the synthesis of cetyl myristate in an open-air reactor with 1 g of biocatalyst (60 °C, 350 rpm), proving that all of them were suitable for obtaining this kind of wax esters.

Nonetheless, during the desorption assays a slight residual synthetic activity was detected in the reaction mixture after the biocatalysts removal. This can be happened because not enough washes have been performed after enzyme's immobilisation, as it is pointed out by the protein content detected in Lowry's assay to the second phosphate buffer washes.

8.3.3.2. Optimisation of the synthesis in a high performance reactor.

• Influence of biocatalyst concentration

The study of the influence of the concentration of immobilised enzyme in reaction medium was carried out for each one of the esters. The amount of biocatalyst assayed varied from a range from 0.125 to 1 g, except for Lewatit derivative, which was also tested with 2 g.

All reactions were performed at 70 °C and 350 rpm, obtaining similar results to the ones observed with commercial biocatalysts: the evolution of conversion with time was not linear and reaction rate was improved with the increase of biocatalyst's concentration, but not proportionally, until reaction medium becomes "saturated" of catalytic species.

Despite this, by using the in-lab derivatives the influence of matrices' properties was more evident. Assays performed with polystyrene supports Lewatit, Amberlite and ECR 1090 M pointed out that narrow pore diameters negatively affected the synthesis of the esters, as they difficult the diffusion of the substrates and products within the biocatalyst (Figure 8.2). Apart from that, octadecyl methacrylate matrix ECR 8806 M exhibited better results than Amberlite, which proves that this polymer is more suitable than polystyrene for the solvent-free esterification of lauric, myristic, palmitic and stearic acid with cetyl alcohol.



Figure 8.2- Synthesis of cetyl stearate in a high performance reactor using 0.125 g of the polystyrene matrices Lewatit, Amberlite and ECR 1090 M (20 g, 1:1, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h N₂, 160 mmHg).

Regarding ECR 8285 M, results confirm that covalently bound CalB exhibits an activity similar to the one observed when adsorbed.

In view of the foregoing, 0.5 g of Lewatit and Amberlite derivatives was selected as the optimum amount biocatalyst, while 0.25 g were chosen for ECR 1090 M, ECR 8806 M and ECR 8285 M.

- 406 -

• Influence of the temperature

The biocatalysts were tested in the synthesis of spermaceti between 60 and 80 °C and no denaturation of the enzyme was detected. So, 70 °C was also selected as best process temperature, as it compromises energy and substrate's conditioning requirements.

• Storage stability of the biocatalysts

The synthesis of cetyl myristate (0.25 g of IME, 70 °C, 350 rpm) was carried at regular periods of time within a year with a particular batch of each Lipozyme[®] CALB L immobilised derivative, proving that they keep their activity during the time range studied when stored in a closed refrigerated recipient.

• Biocatalyst reuse

In order to study the in-lab derivatives reusability, the synthesis of spermaceti was performed repeatedly under the optimum conditions until a maximum of 15 uses. As it can be seen in Figure 8.3, only Amberlite and ECR 8806 M showed an appropriate operational stability.



Figure 8.3- Conversion reached after 60 min during the reuse test in the high performance reactor (20 g, 70 °C, 350 rpm, 54 L/h N₂, 160 mmHg).

• Influence of the stirring

As a consequence of the biocatalyst reusability studies, the synthesis of spermaceti was carried out at best reaction conditions but varying the stirrer's speed (150 and 250 rpm). During this study it was concluded that the esterification process can be performed at 250 rpm without significant variation of the results compared to 350 rpm assay.

• Comparison with Novozym[®] 435

Assays were performed with the quantity of Lipozyme[®] CALB L derivatives and Novozym[®] 435 enough to have 50 mg of CalB inside the reaction medium. Results pointed out that the in-lab biocatalyst showed a greater activity than the commercial one.

8.3.4. Kinetic model for the synthesis of spermaceti.

A kinetic model describing the synthesis of spermaceti has been developed. Taking into consideration the high viscosity of the reaction medium, mass transfer was considered the controlling step of the process. As a consequence, substrate concentration in the vicinity of the enzyme is lower than in the bulk of the reactor and the reaction takes places as far as the substrates are adsorbed into the active site of the lipase. These hypotheses led to an equation describing a pseudo-first order reaction:

$$x = 1 - e^{-k_r t}$$

According to the kinetic model, the rate constant of the global process value, k_r (min⁻¹), depends on several parameters that can be considered constant, such as the reactor's volume or the active site concentration per gram of biocatalyst.

The reaction rate coefficient was found based on the experimental values of the conversion (*x*) over time (*t*, expressed in minutes) acquired during the biocatalyst concentration studies, proving that $1/k_r$ is proportional to the inverse value of the amount of immobilised derivative employed for the esterification process. In addition, it was also pointed out that k_r values increased as the temperature of the synthesis of spermaceti assays was higher and, furthermore, that k_r calculated by a weighted average of the constants obtained during the study of the biocatalyst concentration are similar to the ones predicted by the model for spermaceti synthesis, as it can be observed for ECR 8806 M in the Table 8.5.

Compound	Global reaction rate constant, $k_r (min^{-1})$	% in spermaceti	Contribution to spermaceti's k _r (min ⁻¹)		
Cetyl laurate	0.0680	15.31	0.0104		
Cetyl myristate	0.0637	37.76	0.0240		
Cetyl palmitate	0.0616	38.78	0.0239		
Cetyl stearate	0.0626	8.16	0.0051		
Spermaceti's calculated $k_r (min^{-1})$ 0.0634					
Spermaceti's k _r predicted by the kinetic model (min ⁻¹) 0.0651					

Table 8.5- Determination of the reaction rate coefficient of the synthesis of spermaceti by means of the rate constants of each one of the esters (0.25 g of IME, 70 °C, 350 rpm).

8.3.5. Application of the enzymatic compounds as cosmetic ingredients.

8.3.5.1. Adaptation of the spermaceti and the esters to the commercial specifications.

Considering the fact that natural spermaceti composition may present slight differences depending on the sample and that specific legal standards for the use of spermaceti in cosmetic industry are not established, data sheets for the main producers of this compound are nowadays a good reference to set the minimum requirements for its use in cosmetic formulations.

Tables 8.6 and 8.7 compare the physicochemical characterization of the enzymatic esters and spermaceti with the specifications of several manufacturers of these compounds through classic chemical synthesis, putting into evidence that the enzymatic product accomplishes the standards of the commercialized products.

Additionally, HPLC analysis confirmed the absence of unreacted or side products, avoiding the need of undergoing a host of reprocessing steps to meet the demand of an odour and colourless product.

As it was mentioned during the introductory section, the cosmetic compounds obtained via enzymatic processes have the distinctive feature of being catalogued as "natural" according guidelines approved by the Council of Europe expert committee on cosmetics [42].

Duo du ot	Spermaceti				
Product	Commercial [115]	Commercial [116]	Enzymatic		
Appearance	White flakes	Waxy pellets	White wax		
Melting point (°C)	43 - 47	46-49	49.5		
Acid value (mg KOH/g)	≤5.0	≤1.5	2.26 ± 0.40		
Hydroxyl value (mg KOH/g)			3.99 ± 2.39		
Saponification value (mg KOH/g)	109 – 120	105 – 120	116.58 ± 7.89		
Iodine value (g I ₂ /100 g)	≤1.0	≤1.0	0.27 ± 0.15		
Water content (ppm)			3.6		

Table 8.6- Physicochemical characterization of the spermaceti.

Duoduot	Cetyl laurate		Cetyl myristate	
Product	Commercial [38]	Enzymatic	Commercial [111]	Enzymatic
Appearance	White flakes	White wax	Waxy solid	White wax
Melting point (°C)		45.6	54 - 56	55.2
Acid value (mg KOH/g)	≤3.0	2.16 ± 0.45	≤3.0	2.24 ± 0.45
Hydroxyl value (mg KOH/g)		6.59		6.79
Saponification value (mg KOH/g)	125 – 135	127.19	117 – 127 [112]	120.23
Iodine value (g I ₂ /100 g)		0.47	≤0.5	0.21
Water content (%)	≤1	0.45	≤0.2	0 (2.5 ppm)

Table 8.7	- Physico	chemical	characterizat	ion of the	cetyl esters.
-----------	-----------	----------	---------------	------------	---------------

Duaduat	Cetyl palmitate		Cetyl stearate	
Product	Commercial [113]	Enzymatic	Commercial [114]	Enzymatic
Appearance	White flakes	White wax	White flakes	White wax
Melting point (°C)	50 - 60	57.6		62.2
Acid value (mg KOH/g)	≤3.0	2.18 ± 0.38	≤3.0	2.35 ± 0.53
Hydroxyl value (mg KOH/g)		6.89		2.57
Saponification value (mg KOH/g)	100 - 120	107.38	105 – 115	112.86
Iodine value (g I ₂ /100 g)	≤3.0	0.09		0.28
Water content (%)	≤2	0.35	≤1	0.82

8.3.5.2. Influence of the enzymatic products in a cosmetic emulsion.

Once proved that the biotechnological compounds are suitable to be used as cosmetic ingredients, its influence in a cream was evaluated by formulating several O/W emulsion as reported in Section 8.2.2.9, which were analysed as following described.

• Differential scanning calorimetry (DSC)

A preliminary study of the thermal behaviour of the ingredients was carried out by the DSC analysis. Each enzymatic ester exhibited a thermogram with a sharp sole melting peak, due to their high purity degree. As expected, the melting point of the pure cetyl esters raised as the length of the carbon chain increased, almost proportionally ($R^2 = 0.9313$), ranging from 45 °C to 63 °C. The analogue of spermaceti's melting point was lower than the values obtained for the two main components of the spermaceti: cetyl myristate and cetyl palmitate.

DSC analysis for the cosmetic emulsions showed their heterogeneous composition, with split melting peaks of enzymatic esters at lower temperatures, compared to the ones obtained for pure compounds. The multiple peaks observed can be attributed to the presence of different coexisting crystallizations of some ingredients or to a wide polydispersity of the droplet's size within the emulsion [117].

Oil phase with and without the emulsifier DUB 340 was also studied, leading to thermograms where the melting peaks appear in the same order, but at lower temperatures and less defined than the pure compounds.

• Texture analysis

In light of the DSC results, the impact of temperature on the macroscopic properties of cetyl esters based emulsions was evaluated by subjecting them to a penetration assay at temperatures ranging from 10 to 50 °C. The maximum positive force (F+) and the positive area (A+) of the penetration tests, when the force applied by the probe is represented versus the time of the assay, was measured. These parameters describe the force and the work that has to be done to penetrate the sample and are related to the firmness (F+) and consistency (A+) of a cream.

As it can be observed in Figure 8.4, the presence of the cetyl esters or the spermaceti analogue significantly influences the behaviour of the creams during the penetration assays. Firmness and consistency follow similar tendencies, as a decrease of F+ and A+ values as is observed as temperature increases. These results make patent that the effect of the temperature on the reduction of the firmness or the consistency is nearly proportional to the number of carbons of the cetyl laurate, myristate, palmitate and stearate creams ($R^2 = 0.9265$ for F+, $R^2 = 0.9336$ for A+). Concerning the spermaceti, it was found a percentage of reduction of its firmness and consistency comprised between the values calculated for its two main components.



Figure 8.4- Medium positive force for penetration assays at different temperatures.

On the other hand, measurements of the spreadability of the emulsions pointed out that the presence of the four esters or the spermaceti considerably increases the work to be performed to extend the cream, if compared to the standard emulsion. Nevertheless, no significant differences are observed in the spreading properties of the creams containing the biotechnological compounds.

• Granulometry

As the texture characteristics are not only related to the emulsion's composition, but also to its microstructure, the samples were analysed using a laser diffraction granulometer, proving that the droplet distribution was mainly non-symmetric and polydisperse as it was predicted by the DSC analysis of the emulsions.

Table 8.9 gathers the median diameter of the oil phase particles, D50, and the D90 and D10 values (diameters as of 90% of the distribution lies below the D90, and 10% of the population lies below the D10). As it can be noticed, D50 behaviour appears to be opposed to the results observed in the penetration assays. Consequently, it could be inferred that emulsions with a rougher structural framework should exhibit lower values of firmness and consistency than emulsions with lower droplet size. In the case of the spermaceti emulsion, the complex composition of esters mixture may be interfering in the relation between particle size and the texture analysis results.

Ingredient	D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)
Standard	0.87 ± 0.23	15.3 ± 2.3	45.3 ± 7.5
Cetyl laurate	1.2 ± 0.4	12.7 ± 0.7	47.1 ± 1.1
Cetyl myristate	3.7 ± 0.2	18.2 ± 1.0	47.8 ± 2.7
Cetyl palmitate	6.5 ± 1.2	34.5 ± 0.5	72.5 ± 2.0
Cetyl stearate	3.9 ± 0.2	13.7 ± 0.8	37.2 ± 1.2
Spermaceti	2.2 ± 0.1	17.3 ± 0.7	48.9 ± 3.5

Table 8.9- Particle size analysis of the emulsions.

• Optical microscopy

The cosmetic creams were studied one, six and nine days after its formulation, without perceiving any destabilisation of the emulsion. As it has been previously pointed out by the DSC and the granulometric analysis, the samples possessed a heterogeneous microstructure, with a wide variety of shapes and sizes among the droplets. The microscopic examination of the emulsions also showed differences of appearance between them, with the presence of crystals and several aggregation levels.

8.3.6. Economic evaluation of spermaceti's synthesis at laboratory scale.

The cost, performance and stability of a biocatalyst are critical issues for its industrial application. Once the activity and the reusability have been evaluated, a brief economic study of the process has been done taking into account the cost of the energy, reagents and biocatalyst that entails the synthesis of the spermaceti under optimum conditions.

Although its price is the lowest among the commercial biocatalyst, carrying out the synthesis of spermaceti with Lipozyme[®] TL IM is the most expensive process due to the need of a higher operation time. By contrast the good technical features of CalB derivatives, Novozym[®] 435 and CalB immo Plus can counteract the expensive market prices of these products.

Besides, the immobilisation cost has been calculated for the in-lab derivatives, showing that adsorption into Lewatit was the cheapest option, while immobilising into the covalent bounding carrier was the most expensive process because of the price of ECR 8285 M carrier. Within these biocatalysts, the cost of the synthesis of spermaceti is the lowest for Amberlite and ECR 8806 M as they are the only ones exhibiting a proper reusability. For instance, the biocatalyst cost for Amberlite derivative, which can be reused up to 15 times, represents a 7.2% of the total cost, while the weight of ECR 1090 M, which can only be effectively used in three consecutive cycles, supposes a 22.1%.

8.4. Conclusions.

The conclusions drawn from the results of the experimental work performed within this Doctoral Thesis are exposed bellow.

- 1. From the previous experiments performed at atmospheric pressure with the commercial derivatives it be deduced that:
- 1.1. Compared to the synthesis in an open-air reactor, the use of low pressure and inert atmosphere conditions in a high performance reactor improves reaction rate and leads to higher conversions, lower acid values in the final product and a better reproducibility of the results.
- 1.2. No leakage of the lipase contained in the commercial biocatalysts into reaction medium was detected.
- 2. The optimisation of the biocatalyst concentration with the commercial biocatalysts has pointed out that:
- 2.1. It is possible to obtain the cetyl esters by using CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM and Lipozyme[®] TL IM.
- 2.2. Similar degrees of esterification can be achieved by using different concentrations of biocatalyst, being shorter the operation time required for the highest concentrations tested, even if the improvement of the reaction rate is not proportional to the amount of enzyme in the reaction medium.
- 2.3. Although decreases of the reaction rate can be noticed as the carbon chain length increases, for practical purposes it is the concentration of biocatalyst which determines the time necessary to reach the chemical equilibrium.
- 2.4. The optimum amount of biocatalyst selected for *Candida antarctica* lipase B and *Rhizomucor miehei* biocatalysts was 0.5 g. 1 g was chosen for Lipozyme[®] TL IM, as it exhibited a lower activity than the rest of enzymatic preparations due to its carrier's hydrophilic character and *Thermomyces lanuginosus*' specificity.
- 3. During the study of the influence of the temperature in the synthesis of spermaceti with the commercial biocatalyst it was concluded that:
- 3.1. CalB immo Plus, Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM and Lipozyme[®] TL IM are able to satisfactorily catalyse the one-step synthesis of spermaceti in a solvent-free system.
- 3.2. The increase of temperature lead to an improvement of the reaction rate within the range studied for *Candida antarctica* lipase B and *Rhizomucor miehei* immobilised

derivatives, while the increasing of temperature up 70 °C did not improved results for *Thermomyces lanuginosus* preparation, pointing out that this enzyme may be less resistant to temperature.

- 3.3. 70 °C was selected as the optimum temperature in all cases, as a higher temperature significantly increases energy consumption and a longer conditioning time is required when operating at 60 °C.
- 4. The results of the operational stability test predict a good long-term reusability of the commercial biocatalysts for the synthesis of spermaceti at industrial scale, as they were successfully recovered and recycled up to 15 times.
- 5. During the immobilisation of Lipozyme[®] CALB L into Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M and ECR 8285 M it was deduced that:
- 5.1. The immobilisation of the lipase contained in Lipozyme[®] CALB L, either by adsorption or by covalent binding, into the macroporous resins has been performed with good outcomes in terms of immobilisation yield and protein loading for all the supports tested.
- 5.2. Immobilisation results for Lewatit, Amberlite and ECR 1090 M proved *Candida antarctica* lipase B has a great affinity with polystyrene matrices and that the carrier's pore diameter smaller than 300 400 Å is a limiting factor when immobilising this enzyme.
- 5.3. The comparison of the immobilisation results of ECR 8806 M with Amberlite confirmed that high surface areas are required to guarantee high protein loading by adsorption of the lipase.
- 6. A residual synthetic activity was observed in the reaction mixture during the desorption experiments in an open-air reactor with Lipozyme[®] CALB L derivatives, probably due to a insufficient washing process of the biocatalysts after the enzyme's immobilisation.
- 7. As a result of the experiments performed with Lipozyme[®] CALB L derivatives to optimise the biocatalyst concentration, the following conclusions were obtained:
- 7.1. Lewatit, Amberlite, ECR 1090 M, ECR 8806 M and ECR 8285 M derivatives are able to catalyse the esterification process of lauric, myristic, palmitic and estearic acid with cetyl alcohol.
- 7.2. The reaction rate improved with as the amount of biocatalyst used was increased, but not proportionally.

- 7.3. Results provided by the polystyrene carriers pointed out that increasing the pore diameter leads to better reaction rates, as diffusion processes within the support are easier.
- 7.4. The evolution of conversion over time for ECR 8806 M proved that the chemical composition of the matrix is another major parameter to consider, as octadecyl methacrylate seems to be more suitable than polystyrene for the synthesis of the cetyl esters.
- 7.5. Reaction rates for ECR 8285 M derivative showed that the covalent binding protocol makes possible the immobilisation of *Candida antarctica* lipase B without a significant loss of activity, if compared with adsorption results.
- 7.6. 0.5 g was chosen as the optimum amount of Lewatit and Amberlite biocatalysts, whereas 0.25 g was selected for ECR 1090 M, ECR 8806 M and ECR 8285 M.
- 8. The optimisation of the temperature of the synthesis of spermaceti when using immobilised Lipozyme[®] CALB L pointed out that:
- 8.1. The simultaneous esterification of the cetyl esters with the same proportions as natural spermaceti can be carried out by the in-lab biocatalysts.
- 8.2. Reaction rate was improved with temperature in all cases, being 70 °C the one selected as the optimum.
- 9. The Lipozyme[®] CALB L derivatives exhibited good storage stability and maintained intact its activity during, at least, 12 month after their immobilisation. However, only Amberlite and ECR 8806 M turned out to be stable when reused in 15 consecutive batches, probably due to the nature and degree of cross-linking of the polymer constituting the carriers.
- 10. In view of the operational stability of Lewatit, ECR 1090 M and ECR 8285 M, spermaceti synthesis was performed at stirring speeds lower than 350 rpm, proving that a good degree of mixing can be achieved at 250 rpm.
- 11. The comparison of Novozym[®] 435 with the Lipozyme[®] CALB L biocatalysts when the same amount of lipase is present in reaction media pointed out that the in-lab derivatives had a better activity than the commercial one. This is mainly due to the greater hydrophobicity of the carriers tested compared to the Novozym[®] 435's one.

- 12. According to the kinetics of the esterification processes, it can be stated that:
- 12.1. The synthesis of the cetyl esters and the spermaceti is chiefly controlled by mass transfer limitations and can be described with a pseudo-first order model quite accurately.
- 12.2. It has been proved that the inverse value of the rate coefficient of the global process, k_r , is proportional to the inverse of the amount of biocatalyst present in reaction medium, among other factors.
- 12.3. While calculating k_r values based on temperature assays for the synthesis of spermaceti with the different biocatalysts, it has been pointed out that, as a general trend, the rate coefficient follows Arrhenius equation.
- 12.4. The rate constant of the synthesis of spermaceti can be predicted with quite good accuracy by means of the reaction rate coefficients values (calculated under the same experimental conditions) of each one of the cetyl esters.
- 13. During the evaluation of the enzymatic compounds as cosmetic ingredients, it has been observed that:
- 13.1. The physicochemical characterisation of the cetyl esters and the spermaceti demonstrates that enzymatic-synthesised compounds are similar to the ones obtained through conventional industrial processes, which are currently commercialised.
- 13.2. HPLC analysis of intermediate samples confirmed that during the one-step synthesis of the spermaceti, the esters are synthesised simultaneously, with similar composition to the one desired in the final product.
- 13.3. HPLC and DSC analysis of the final product proved that the enzymatic esters have a high purity, with no presence of by-products or unreacted substrates.
- 13.4. The cosmetic emulsions formulated by using the biotechnological compounds turned out to have a heterogeneous microstructure, where it can be found a wide variety of sizes among the droplets, as it can be pointed out by the granulometric analysis. The microscopic examination of the samples also shows differences of appearance between the creams, with the presence of crystals and several aggregation levels.
- 13.5. DSC analysis for the cosmetic creams containing the enzymatic products proved that the thermal profile depended on the emollient used but also on the structure of the emulsion and on the interactions between the different constituents.
- 13.6. During the penetrations assays performed at various temperatures, it was evidenced a decrease of the emulsions' consistency and firmness with the

increasing temperature, as the gradual passing from the solid to the liquid state of cetyl esters and spermaceti happens.

- 13.7. The firmness and consistency of the creams containing the esters with longer carbon chain were less impacted by temperature variations, as they conferred to them a higher stability and resistance to thermal changes.
- 13.8. Although the thermal behaviour of the cosmetic formulations is dependent on its composition, the effect of the emulsion's microstructure cannot be neglected.
- 13.9. Any clear distinction in their performance as cosmetic ingredients can be established between the commercial and the enzymatic cetyl laurate and cetyl palmitate according to their synthetic origin.
- 14. The economic evaluation of spermaceti's synthesis under best reaction conditions at laboratory scale leads to the following conclusions:
- 14.1. The consumption of energy and the carrier price represent between the 73 and the 85% of the immobilisation cost independently of the protocol used, which might be lessen by increasing the scale of the process.
- 14.2. The reusability of the biocatalyst, and hence, its operational stability, has a major influence on the global cost of the spermaceti's production.
- 14.3. The use of a cheaper biocatalyst does not mean a reduction in the overall cost of the synthesis, since this will depend on the balance between the cost of the derivative, the amount needed to carry out the process and its stability.
- 14.4. The synthesis of spermaceti using Lipozyme[®] RM IM is the most rentable among the commercial biocatalyst, while it is for ECR 8806 M derivative among the in-lab ones.
- 15. This Doctoral Thesis proves the feasibility of the one-step biocatalytic synthesis of a product similar to natural spermaceti, a substance with a wide range of applications in the cosmetic field. With the final purpose of implementing this product at commercial level, the process has been optimised and it is ready to be scaled-up from the laboratory to a pilot plant. Moreover, this work constitutes a solid basis for the development of the enzymatic synthesis of many other cosmetic esters.

8.5. Bibliography.

- 1 Holthuis L. The Scientific Name of the Sperm Whale. *Mar. Mamm. Sci.* 1987; **3**: 87–88; DOI:10.1111/j.1748-7692.1987.tb00154.x.
- 2 Schevill W. The Scientific Name of the Sperm Whale Reply. *Mar. Mamm. Sci.* 1987; **3**: 89–90; DOI:10.1111/j.1748-7692.1987.tb00155.x.
- 3 Rice DW. Spermaceti. In *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*, William F. Perrin BW, J.G.M. Thewissen (eds). Academic Press: London, 2009; 1098–1099.
- 4 Clarke M. Structure and Proportions of Spermaceti Organ in Sperm Whale. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1978; **58**: 1-17.
- 5 Clarke MR. Function of the Spermaceti Organ of the Sperm Whale. *Nature*. 1970; **228**: 873–874; DOI:10.1038/228873a0.
- 6 Madsen PT, Payne R, Kristiansen NU, Wahlberg M, Kerr I, Møhl B. Sperm Whale Sound Production Studied with Ultrasound Time/Depth-Recording Tags. *J Exp Biol.* 2002; 205: 1899–1906.
- 7 Møhl B, Wahlberg M, Madsen PT, Heerfordt A, Lund A. The Monopulsed Nature of Sperm Whale Clicks. J. Acoust. Soc. Am. 2003; 114: 1143–1154; DOI:10.1121/1.1586258.
- 8 Møhl B. Sound Transmission in the Nose of the Sperm Whale Physeter Catodon. A Post Mortem Study. *J Comp Physiol A*. 2001; **187**: 335–340; DOI:10.1007/s003590100205.
- 9 Whitehead H. Estimates of the Current Global Population Size and Historical Trajectory for Sperm Whales. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 2002; 242: 295–304; DOI:10.3354/meps242295.
- 10 Reeves RR. Marine Mammals, History of Exploitation. In *Marine Policy & Economics: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences*, Steele JH, Thorpe SA, Turekian KK (eds). Academic Press: London, 2010.
- 11 WDC, Whale and Dolphin Conservation http://uk.whales.org/ (accessed November 18, 2016).
- 12 CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. https://www.cites.org/ (accessed December 2, 2016).
- 13 Whitehead H, Christal J, Dufault S. Past and Distant Whaling and the Rapid Decline of Sperm Whales off the Galapagos Islands. *Conserv. Biol.* 1997; **11**: 1387–1396; DOI:10.1046/j.1523-1739.1997.96246.x.
- 14 Laist DW, Knowlton AR, Mead JG, Collet AS, Podesta M. Collisions Between Ships and Whales. *Mar. Mamm. Sci.* 2001; **17**: 35–75; DOI:10.1111/j.1748-7692.2001.tb00980.x.

- 15 Fais A, Lewis TP, Zitterbart DP, Álvarez O, Tejedor A, Soto NA. Abundance and Distribution of Sperm Whales in the Canary Islands: Can Sperm Whales in the Archipelago Sustain the Current Level of Ship-Strike Mortalities? *PLOS ONE*. 2016; 11: e0150660; DOI:10.1371/journal.pone.0150660.
- 16 Gero S, Whitehead H. Critical Decline of the Eastern Caribbean Sperm Whale Population. *PLOS ONE*. 2016; **11**: e0162019; DOI:10.1371/journal.pone.0162019.
- 17 Dorgan PD. On the Oils in Cosmetic Use of Marine Composition. *Drugs and Cosmetic*. 1974; **12**: 30–37.
- 18 Singh SK. Handbook on Cosmetics (Processes, Formulae with Testing Methods). ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc.: Delhi, 2010.
- 19 Kikuchi K, Tagami H. Noninvasive Biophysical Assessments of the Efficacy of a Moisturizing Cosmetic Cream Base for Patients with Atopic Dermatitis during Different Seasons. *Br. J. Dermatol.* 2008; **158**: 969–978; DOI:10.1111/j.1365-2133.2008.08478.x.
- 20 Khalil S, Elgamal S. In-Vitro Release of Aspirin from Various Wax-Coated Formulations. *J. Pharm. Pharmacol.* 1971; **23**: 72-74.
- 21 Gross H, Becker C. A Study of Suppository Bases. 1. Review of Literature. J. Am. Phar. Assoc. Scientific Edition. 1953; 42: 90–95.
- 22 Sriamornsak P, Asavapichayont P, Nunthanid J, Luangtana-anan M, Limmatvapirat S, Piriyaprasarth S. Wax-Incorporated Emulsion Gel Beads of Calcium Pectinate for Intragastric Floating Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2008; **9**: 571– 576; DOI:10.1208/s12249-008-9082-4.
- 23 Dolin EJ. Leviathan: The History of Whaling in America. W. W. Norton & Company: New York, 2008.
- 24 Virgin I, Morris EJ. Creating Sustainable Bioeconomies: The Bioscience Revolution in Europe and Africa. Routledge ed.: Abingdon, 2016.
- 25 Suzuki T, Ikesu S, Takahashi M. Anthraquinone Dye and Inkjet Recording Liquid. US7025816 B2. April 11, 2006.
- 26 Nakamura Y, Nogami Y, Ohki Y. Process for Cleaning and Image Forming Apparatus Therefor. US7177578 B2. February 13, 2007.
- 27 Kuroki T, Maehashi T. Image Forming Method Utilizing Thermal Transfer Intermediate Transfer Medium. US6951832 B2. October 4, 2005.
- 28 Nakamura Y, Nogami Y. Image Forming Process and Image Forming Apparatus, Electrophotographic Image-Receiving Sheet, and Electrophotographic Print. US7057631 B2. June 6, 2006.

- 29 Wellendorf M. Composition of Spermaceti. *Nature*. 1963; **198**: 1086–1087; DOI:10.1038/1981086b0.
- 30 Horiguchi T, Takase Y, Arai Y, Ageta H. GC-MS Studies on Ester Components of Spermaceti. J. Nat. Med. 1999; 53: 105–108.
- 31 Carlier A, Chaignea.m, Giry L, Puisieux F, Lehir A. Analysis of Pomades .6. Mass Spectrometric Assay of Cetaceum. *Ann. Pharm. Fr.* 1968; **26**: 599-602.
- 32 Carlier A, Puisieux F, Lehir A. Analyse Des Pommades .3. Etude De La Composition Du Blanc De Baleine. *Ann. Pharm. Fr.* 1967; **25**: 473-480.
- 33 Holloway P. Chromatographic Analysis of Spermaceti. J. Pharm. Pharmacol. 1968; 20: 775-779.
- 34 Spencer WP. Compositions and Methods for Increased Delivery of Coenzyme Q10. WO2012015969 A1. February 2, 2012.
- 35 Barathur RR, Bookout JB. Transdermal Delivery of Medicaments with Combinations of Cetylated Fatty Ester Penetrant Complexes. US8394759 B2. March 12, 2013.
- 36 Haas PD, Firat OF, Kandemir L, Koc F, Sivasligil R. A Preparation Method for Suspension of Cetyl Myristate and/or Cetyl Palmitate. WO2012089764 A1. July 5, 2012.
- 37 Cosmetic Supplies USA Inc. Cetyl palmitate data sheet http://www.cosmeticsuppliesusa.com/pdf/SpecCetylPalmitate.pdf (accessed November 11, 2016).
- 38 Venus Ethoxyethers Pvt, Ltd,. Cetyl laurate data sheet http://www.venusgoa.com/%20laurato (accessed November 11, 2016).
- 39 Cosmetic Europe, Risk and Policy Analysts Ltd. Socio-economic development & environmental sustainability. The Europeancometics industry's contribution 2017, 2017. https://www.cosmeticseurope.eu/files/8614/9738/2777/CE_Socio-economic_development_and_environmental_sustainability_report_2017.pdf (accessed September 5, 2017).
- 40 STANPA : Asociacion Nacional de Perfumería y Cosmética http://www.stanpa.com/ (accessed December 2, 2016).
- 41 BOE, document DOUE-L-2009-82517 https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82517 (accessed December 1, 2016).
- 42 Newerli-Guz J. Labelling of organic and natural cosmetic products in harmonized standards. *Zeszyt Naukowy*. 2012; **74**: 36–42.
- 43 Ecocert S.A.S. Standards for Natural and Organic Cosmetics, 2003 http://www.makingcosmetics.com/articles/Ecocert-cosmetics-standards.pdf (accessed December 17, 2016).

- 44 COSMOS-standard AISBL. COSMOS-standard Technical Guide, 2016 https://cosmosstandard.files.wordpress.com/2016/12/cosmos-standard-technical-guide-v2-10-2511162.pdf (accessed December 22, 2016).
- 45 Barel AO, Paye M, Maibach HI. *Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition*. Taylor & Francis: New York, 2009.
- 46 Harry RG, Rieger MM. *Harry's Cosmeticology 8th Edition*. Chemical Publishing Company: New York, 2000.
- 47 Griffin WC. Classification of Surface-Active Agents by "HBL." J. Cosmet. Sci. 1949; 1: 311–326.
- 48 Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Khan ZI, Khar RK, Aqil M, Talegaonkar S. Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2008; **2**: 275–289.
- 49 Parente ME, Gambaro A, Solana G. Study of Sensory Properties of Emollients Used in Cosmetics and Their Correlation with Physicochemical Properties. *J. Cosmet. Sci.* 2005; 56: 175–182.
- 50 Savary G, Grisel M, Picard C. Impact of Emollients on the Spreading Properties of Cosmetic Products: A Combined Sensory and Instrumental Characterization. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*. 2013; **102**: 371–378; DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.07.028.
- 51 Gilbert L, Savary G, Grisel M, Picard C. Predicting Sensory Texture Properties of Cosmetic Emulsions by Physical Measurements. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 2013; 124: 21–31; DOI:10.1016/j.chemolab.2013.03.002.
- 52 Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A Combined Approach in Characterization of an Effective w/o Hand Cream: The Influence of Emollient on Textural, Sensorial and in Vivo Skin Performance. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2012; **34**: 140–149; DOI:10.1111/j.1468-2494.2011.00693.x.
- 53 Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Dokic L, Savic S. Effect of Small Change in Oil Phase Composition on Rheological and Textural Properties of w/o Emulsion. *J. Texture Stud.* 2013; **44**: 34–44; DOI:10.1111/j.1745-4603.2012.00363.x.
- 54 Gallarate M, Mittone E, Carlotti ME, Trotta M, Piccerelle P. Formulation of Dry Emulsion for Topical Applications. *J. Dispersion Sci. Technol.* 2009; **30**: 823–833; DOI:10.1080/01932690802643998.
- 55 Wardhono EY, Zafimahova-Ratisbonne A, Lanoiselle J-L, Saleh K, Clausse D. Optimization of the Formulation of Water in Oil Emulsions Entrapping Polysaccharide by Increasing the Amount of Water and the Stability. *Can. J. Chem. Eng.* 2014; **92**: 1189–1196; DOI:10.1002/cjce.21985.
- 56 Gorcea M, Laura D. Evaluating the Physiochemical Properties of Emollient Esters for Cosmetic Use. *Cosmetics and toiletries*. 2010; **125**: 26–33.

- 57 Emollients : National Eczema Society http://www.eczema.org/emollients (accessed January 3, 2017).
- 58 Hughes KJ, Lvovich VF, Woo J, Moran B, Suares A, Truong MHT. Novel Methods for Emollient Characterization. *Cosmetics and toiletries Manufacture Worldwide*. 2010; 19–24.
- 59 United Nations. *Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future*, Report. 1987.
- 60 Anastas PT, Warner JC. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press: New York, 1998.
- 61 Bommarius AS, Riebel BR. *Biocatalysis, Fundamentals and Applications, First edition.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2004.
- 62 Lozano P, de Diego T, Carrié D, Vaultier M, Iborra JL. Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150 °C. *Biotechnol Progress*. 2003; **19**: 380–382; DOI:10.1021/bp0257590.
- 63 Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 °C. *Science*. 1984; **224**: 1249–1251.
- 64 Knez Ž, Laudani CG, Habulin M, Reverchon E. Exploiting the Pressure Effect on Lipase-Catalyzed Wax Ester Synthesis in Dense Carbon Dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* 2007; 97: 1366–1375; DOI:10.1002/bit.21331.
- 65 Yuan J, Dai Y, Yu Y, Wang P, Wang Q, Fan X. Biocatalytic Synthesis of Poly(ε-Caprolactone) Using Modified Lipase in Ionic Liquid Media. *Eng. Life Sci.* 2016; **16**: 371–378; DOI:10.1002/elsc.201500081.
- 66 Weber N, Weitkamp P, Mukherjee KD. Steryl and Stanyl Esters of Fatty Acids by Solvent-Free Esterification and Transesterification in Vacuo Using Lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 5210–5216; DOI:10.1021/jf0107407.
- 67 Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. Springer: Heidelberg, 2011.
- 68 Jegannathan KR, Nielsen PH. Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production - a Literature Review. J. Clean Prod. 2013; 42: 228–240; DOI:10.1016/j.jclepro.2012.11.005.
- 69 Arroyo M. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. Ars *Pharmaceutica*. 1998; **39:2**: 23–29.
- 70 Cao L. *Carrrier-Bound Immobilized Enzymes*, First. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2005; DOI:10.1002/3527607668.

- 71 Kapoor M, Gupta MN. Lipase Promiscuity and Its Biochemical Applications. *Process Biochem.* 2012; **47**: 555–569; DOI:10.1016/j.procbio.2012.01.011.
- 72 Kwon S, Song K, Hong W, Rhee J. Removal of Water Produced from Lipase-Catalyzed Esterification in Organic-Solvent by Pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.* 1995; **46**: 393–395; DOI:10.1002/bit.260460413.
- 73 Lei Q, Ba S, Zhang H, Wei Y, Lee JY, Li T. Enrichment of Omega-3 Fatty Acids in Cod Liver Oil via Alternate Solvent Winterization and Enzymatic Interesterification. *Food Chem.* 2016; **199**: 364–371; DOI:10.1016/j.foodchem.2015.12.005.
- 74 Otero C, Márquez P, Criado M, Hernández-Martín E. Enzymatic Interesterification Between Pine Seed Oil and a Hydrogenated Fat to Prepare Semi-Solid Fats Rich in Pinolenic Acid and Other Polyunsaturated Fatty Acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 2012; 90: 81–90; DOI:10.1007/s11746-012-2149-0.
- 75 Kaki SS, Grey C, Adlercreutz P. Bioorganic Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Esters of Natural Phenolics and α-Lipoic Acid. J. Biotechnol. 2012; 157: 344– 349; DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.11.012.
- 76 Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. *Biocatalysts and Enzyme Technology*, First edition. Wiley Vch Verlag Gmbh: Weinheim, 2005.
- 77 Pleiss J, Fischer M, Schmid RD. Anatomy of Lipase Binding Sites: The Scissile Fatty Acid Binding Site. *Chem. Phys. Lipids.* 1998; **93**: 67–80; DOI:10.1016/S0009-3084(98)00030-9.
- 78 Verger R. 'Interfacial Activation' of Lipases: Facts and Artifacts. *Trends Biotechnol*. 1997; **15**: 32–38; DOI:10.1016/S0167-7799(96)10064-0.
- 79 Ferrario V, Ebert C, Knapic L, Fattor D, Basso A, Spizzo P, Gardossi L. Conformational Changes of Lipases in Aqueous Media: A Comparative Computational Study and Experimental Implications. *Adv. Synth. Catal.* 2011; 353: 2466–2480; DOI:10.1002/adsc.201100397.
- 80 Adlercreutz P. Immobilisation and Application of Lipases in Organic Media. *Chem. Soc. Rev.* 2013; **42**: 6406–6436; DOI:10.1039/c3cs35446f.
- 81 Klibanov AM. Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents. *Trends Biochem. Sci.* 1989; **14**: 141–144; DOI:10.1016/0968-0004(89)90146-1.
- 82 Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006; **39**: 235–251; DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- 83 Chen S, Lin Y, Zhang Y, Wang XH, Yang JL. Enzymatic Pitch Control at Nanping Paper Mill. *Tappi J.* 2001; **84**.
- 84 Fukuda S, Hayashi S, Ochiai H, Iiizumi T, Nakamura K. Improvers for Deinking of Wastepaper. Japanese patent 2,229,290, 1990.

- 85 Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized Pseudomonas Cepacia Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. *Bioresour. Technol.* 2005; 96: 769–777; DOI:10.1016/j.biortech.2004.05.029.
- 86 Borrelli GM, Trono D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; **16**: 20774–20840; DOI:10.3390/ijms160920774.
- 87 Holm HC, Cowan D. The Evolution of Enzymatic Interesterification in the Oils and Fats Industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; **110**: 679–691; DOI:10.1002/ejlt.200800100.
- 88 Ortega S, Maximo MF, Montiel MC, Murcia MD, Arnold G, Bastida J. Esterification of Polyglycerol with Polycondensed Ricinoleic Acid Catalysed by Immobilised *Rhizopus* oryzae Lipase. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2013; 36: 1291–1302; DOI:10.1007/s00449-012-0874-2.
- 89 Hanson RL, Shi Z, Brzozowski DB, Banerjee A, Kissick TP, Singh J, Pullockaran AJ, North JT, Fan J, Howell J, Durand SC, Montana MA, Kronenthal DR, Mueller RH, Patel RN. Regioselective Enzymatic Aminoacylation of Lobucavir to Give an Intermediate for Lobucavir Prodrug. *Bioorg. Med. Chem.* 2000; 8: 2681–2687; DOI:10.1016/S0968-0896(00)00209-1.
- 90 Gonawan FN, Yon LS, Kamaruddin AH, Uzir MH. Effect of Co-Solvent Addition on the Reaction Kinetics of the Lipase-Catalyzed Resolution of Ibuprofen Ester. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2013; 88: 672–679; DOI:10.1002/jctb.3885.
- 91 Hills G. Industrial Use of Lipases to Produce Fatty Acid Esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003; **105**: 601–607; DOI:10.1002/ejlt.200300853.
- 92 Veit T. Biocatalysis for the Production of Cosmetic Ingredients. *Eng. Life Sci.* 2004; **4**: 508–511; DOI:10.1002/elsc.200402148.
- 93 Kirk O, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Org. Process Res. Dev.* 2002; **6**: 446–451; DOI:10.1021/op0200165.
- 94 Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*. 1994; **2**: 293–308; DOI:10.1016/S0969-2126(00)00031-9.
- 95 Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal Biotransformation*. 1998; 16: 181–204; DOI:10.3109/10242429809003198.
- 96 Uppenberg J, Oehrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthonsen T, Jones TA. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry*. 1995; **34**: 16838–16851; DOI:10.1021/bi00051a035.

- 97 Derewenda Z, Derewenda U, Dodson G. The Crystal and Molecular-Structure of the *Rhizomucor miehei* Triacylglyceride Lipase at 1.9-Angstrom Resolution. *J. Mol. Biol.* 1992; **227**: 818–839; DOI:10.1016/0022-2836(92)90225-9.
- 98 Naik S, Basu A, Saikia R, Madan B, Paul P, Chaterjee R, Brask J, Svendsen A. Lipases for Use in Industrial Biocatalysis: Specificity of Selected Structural Groups of Lipases. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2010; 65: 18–23; DOI:10.1016/j.molcatb.2010.01.002.
- 99 Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a Biocatalyst in Fats and Oils Modification. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2010; **66**: 15–32; DOI:10.1016/j.molcatb.2010.03.008.
- 100 Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2010; 62: 197–212; DOI:10.1016/j.molcatb.2009.11.010.
- 101 Hartree E. Determination of Protein Modification of Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.* 1972; **48**: 422-427; DOI:10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- 102 ASTM D974–02e1, Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2002; DOI:10.1520/D0974-02E01.
- 103 ASTM D1957-86(2001), Standard Test Method for Hydroxyl Value of Fatty Oils and Acids (Withdrawn 2007). ASTM International: West Conshohocken, PA, 1986; DOI:10.1520/D1957-86R01.
- 104 ASTM D5558-95(2011), Standard Test Method for Determination of the Saponification Value of Fats and Oils. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2011; DOI:10.1520/D5558-95R11.
- 105 ASTM D5554-95, Standard Test Method for Determination of the Iodine Value of Fats and Oils. ASTM International: Conshohocken, PA, 1995; DOI:10.1520/D5554-95.
- 106 Zhao X, El-Zahab B, Brosnahan R, Perry J, Wang P. An Organic Soluble Lipase for Water-Free Synthesis of Biodiesel. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007; **143**: 236–243; DOI:10.1007/s12010-007-8043-9.
- 107 The PubChem Project https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed Aug 24, 2016).
- 108 Aguieiras ECG, Veloso CO, Bevilaqua JV, Rosas DO, da Silva MAP, Langone MAP. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme Research*. 2011; 2011: 1–7; DOI:10.4061/2011/432746.

- 109 Martins AB, da Silva AM, Schein MF, Garcia-Galan C, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Comparison of the Performance of Commercial Immobilized Lipases in the Synthesis of Different Flavor Esters. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2014; 105: 18–25; DOI:10.1016/j.molcatb.2014.03.021.
- 110 Serrano-Arnaldos M, Máximo-Martín MF, Montiel-Morte MC, Ortega-Requena S, Gómez-Gómez E, Bastida-Rodríguez J. Solvent-Free Enzymatic Production of High Quality Cetyl Esters. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2016; **39**: 641–649; DOI:10.1007/s00449-016-1545-5.
- 111 JEEN International Corporation. Cetyl Esters Wax JEECHEM MST data sheet http://www.jeen.com/technical/SPEC148.pdf (accessed November 23, 2016).
- 112 Imperial-Oel-Import. Ficha de Especificaciones Spermaceti BP, Synthetic https://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/2531 (accessed November 23, 2016).
- 113 Yasho Industries Pvt. Ltd. Cetyl myristate data sheet http://suppliers.jimtrade.com/92/91396/waxy_solid_cetyl_myristate.htm#2 (accessed November 24, 2016).
- 114 Parchem Fine & Speciality Chemicals. Cetyl myristate data sheet http://www.parchem.com/chemical-supplier-distributor/Cetyl-Myristate-012673.aspx (accessed November 24, 2016).
- 115 Fine Organics Industries Pvt. Ltd. Cetyl palmitate data sheet http://www.fineorganics.com/colombia/nuestros-productos/aditivos-para-cosmeticos-y-productos-farmaceuticos/finester-ester-waxes/cetyl-palmitate (accessed November 24, 2016).
- 116 Venus Ethoxyethers Pvt, Ltd,. Cetyl stearate data sheet http://www.venusgoa.com/estearato (accessed May 21, 2014).
- 117 Clausse D, Gomez F, Pezron I, Komunjer L, Dalmazzone C. Morphology Characterization of Emulsions by Differential Scanning Calorimetry. *Adv. in Colloid and Interface Sci.* 2005; **117**: 59–74; DOI:10.1016/j.cis.2005.06.003.