



Materiales inorgánicos y enzimáticos activos en la esterificación de ácido oleico

Silvana R. Matkovic^{1*}, Juliet F. Nilsson¹, Graciela M. Valle¹, Carlos R. Llerena Suster^{1,2}, María E. Fait², Susana R. Morcelle del Valle², Laura E. Briand¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas – Dr. Jorge J. Ronco CINDECA – CCT La Plata – CONICET. Calle 47 No 257, B1900AJK, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Email: matkovic@quimica.unlp.edu.ar

² Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Depto. de Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, B1900AJK, La Plata, Argentina

Palabras Claves: heteropoliácido, lipasas, ácido oleico, esterificación

Resumen

En esta investigación se determinó la capacidad de varios materiales inorgánicos y enzimáticos para catalizar la esterificación de ácido oleico con metanol. El objetivo general del estudio es explorar materiales catalíticos alternativos para generar biodiesel en fase heterogénea. En este sentido, se analizaron el ácido fosfotúngstico de Wells Dawson másico y soportado sobre TiO₂, una sal del heteropoliácido obtenida a partir de la sustitución parcial de protones por cesio, una mezcla mecánica que simula dicha sal, el biocatalizador comercial Novozym® 435, el látex de *Carica papaya* y de la especie vegetal autóctona *Araujia sericifera* que contienen lipasas auto-soportadas naturalmente.

Las lipasas vegetales catalizan la esterificación de ácido oleico a una temperatura menor que el biocatalizador comercial y los materiales inorgánicos (45 °C, 65 °C y 85 °C, respectivamente). Entre ellas la lipasa de *Araujia sericifera* presenta una actividad específica que es un orden de magnitud superior al resto de los sistemas analizados por lo que constituye un biocatalizador prometedor.

Abstract

The ability of various inorganic and enzymatic materials to catalyze the esterification of oleic acid with methanol was assayed in the present investigation. The aim of this study is to screen alternative catalytic materials to produce biodiesel in heterogeneous reaction conditions. In this context,

The results demonstrated that the lipase obtained from *Araujia sericifera* is a promising biocatalyst in the esterification of fatty acids (such as oleic acid) that are present in the composition of the feedstock used for biodiesel production. On the other hand, highly acid materials such as bulk and oxide supported Wells Dawson heteropolyacid are active in the esterification of oleic acid towards methyl oleate at higher temperatures than the assayed biocatalysts (85 °C vs 45 °C).

Introducción

Es bien conocido que el biodiesel constituye la primera generación de bio-combustibles producidos a partir de aceites vegetales refinados por trans-esterificación de triglicéridos con metanol. La trans-esterificación de aceites vegetales con metanol en presencia de catalizadores alcalinos (KOH, NaOH y los alcóxidos relacionados) en fase homogénea produce una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos. El proceso se realiza a baja temperatura de reacción (60 °C) y a presión atmosférica, sin embargo presenta desventajas tanto económicas como medioambientales [1]. Más recientemente, se han empezado a investigar catalizadores (básicos, ácidos y enzimáticos) que permitirían desarrollar nuevas tecnologías en fase heterogénea en las cuales se utilizan los sustratos líquidos y los catalizadores sólidos conduciendo a la simplificación del proceso de producción de biodiesel. En este contexto, los catalizadores sólidos pueden separarse de la mezcla biodiesel/glicerina y re-usarse, lo que constituye una gran ventaja de la catálisis heterogénea. Los catalizadores sólidos ácidos utilizados en la esterificación de ácidos grasos libres y la trans-esterificación de aceites vegetales son típicamente los heteropoli-compuestos HPCs de estructura Keggin, dióxido de circonio y de titanio ambos sulfatados, resinas de intercambio y zeolitas [2]. En el campo de la catálisis enzimática se destaca que el biocatalizador comercial Novozym® 435 compuesto por la lipasa B de *Candida antarctica* adsorbida sobre polimetilmetacrilato, se ha comenzado a utilizar industrialmente en la producción de biodiesel en los Estados Unidos con muy buenos resultados [3].

En este contexto, se ha estudiado la potencialidad del heteropoliácido fosfotúngstico del tipo Wells Dawson $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O$ (HPA) másico, soportado (HPA/TiO₂) y parcialmente sustituido con cesio; el látex de *Araujia sericifera* (ASL) y *Carica papaya* (CPL) en la generación de biodiesel. Para este fin se ha utilizado la esterificación de ácido oleico con metanol como reacción test.

Experimental

Los experimentos se realizaron en modo batch utilizando un balón de vidrio de tres bocas, con un refrigerante para reflujo, un agitador de paleta de teflón con regulación de velocidad (40 - 700 rpm) y un termómetro electrónico integrado a un sistema de control electrónico del horno eléctrico utilizado como medio de calefacción. Adicionalmente, el sistema cuenta con un septum para la extracción de muestras.

Las reacciones de esterificación se realizaron pesando una masa equivalente a 22.50 ml de ácido oleico (Anebra 61.5 %; densidad: 0.892 g/ml). Se llevaron a la temperatura deseada, luego se añadió el catalizador y seguidamente se inició la reacción con el agregado del metanol absoluto (Carlo Erba 99 %). Se presentan los resultados de muestras tomadas a las 24 hs de iniciada la reacción. Los detalles referidos a cada reacción como la temperatura elegida, y la proporción de ácido oleico: metanol se mostraran en la Tabla 1. Asimismo, se realizaron ensayos “blancos” en las mismas condiciones mencionadas anteriormente sin la presencia del catalizador.

El avance de la esterificación se estableció a través de la determinación del índice de acidez de acuerdo a la normativa europea UNE-EN 14104 [4]. A partir de los índices de acidez se calcularon los μ moles de ácido oleico convertido, se normalizó este valor por la masa total de catalizador utilizado y por el tiempo de reacción. En el caso específico del HPA soportado en TiO₂, la actividad se expresó por masa de fase activa soportada. Asimismo, los productos de reacción se analizaron por espectroscopia infrarroja (FTIR). El análisis se realizó utilizando un espectrofotómetro Vertex 70 con detector DLaTGS con ventana de KBr, el cual posee una resolución de $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$. Las muestras líquidas se colocaron entre dos cristales de KBr para el análisis.

Se investigaron el biocatalizador comercial Novozym® 435 (batch LC20217) y dos lipasas de origen vegetal, una obtenida del látex de *Carica papaya* (CPL) y otra obtenida de *Araujia sericifera* (ASL). La obtención de estos sistemas enzimáticos vegetales se encuentra en la bibliografía [5].

Por otro lado los catalizadores inorgánicos estudiados fueron el heteropoli-ácido fosfotúngstico de Wells Dawson (HPA) másico ($H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot nH_2O$) y disperso en monocapa teórica sobre dióxido de titanio 18 % $H_6P_2W_{18}O_{62}/TiO_2$ cuya síntesis fue publicada previamente [6]. Así mismo, se estudió la sal insoluble de cesio del heteropoli-anión $Cs_2H_4P_2W_{18}O_{62}$ obtenida por coprecipitación [7] y una mezcla mecánica de 0.105 g de $CsNO_3$ y 1.300 g del HPA que corresponde a la proporción de cesio y

y heteropolianion de la sal antes mencionada. Esta mezcla fue calcinada a 260 °C por 4 hs hasta la eliminación del nitrato.

Resultados y discusión

La figura 1 muestra los espectros infrarrojos del medio de reacción, del ácido oleico comercial sin tratamiento y del ensayo “blanco” correspondiente.

En todos los espectros se observa la presencia de dos bandas centradas en 2924 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} . Estas señales se atribuyen a la vibración generada por el estiramiento de los enlaces C-H pertenecientes a los grupos metileno. Las mismas son más intensas en los espectros del ácido oleico y del medio de reacción que en el caso del ensayo del blanco. El espectro correspondiente al medio de reacción, muestra la presencia de una nueva señal centrada en 1743 cm^{-1} que se atribuye a las vibraciones de los enlaces C=O involucrados en el metil éster. Esta vibración evidencia la presencia de metil oleato (componente típico del biodiesel).

Adicionalmente se observan tres bandas características de la vibración del enlace C-O perteneciente a una función éster. Las mismas, se centran en 1242, 1197 y 1172 cm^{-1} , proporcionando evidencia adicional de la presencia del metil oleato [8, 9].

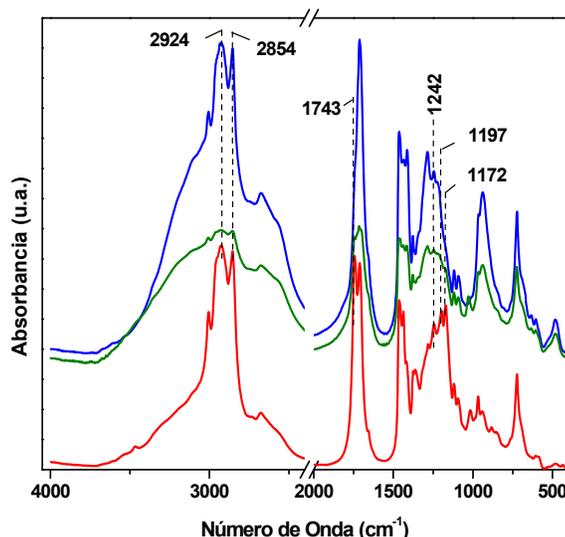


Figura 1. Espectros infrarrojos del ácido oleico comercial (—), ensayo “blanco” a 65 °C (—) y medio de la reacción de esterificación utilizando Novozym® 435 como biocatalizador a 65 °C (—).

Es importante destacar que en los espectros infrarrojos de los medios obtenidos luego de las reacciones catalizadas con el HPA y los biocatalizadores no se observaron las señales características del ácido fosfotúngstico ni de las proteínas, lo cual indicaría que en principio las reacciones se produjeron en fase heterogénea.

Tabla 1. Relación molar de sustratos, temperatura de reacción, actividad específica de la reacción de esterificación de ácido oleico con el HPA másico y soportado sobre TiO_2 , sal $\text{Cs}_2\text{H}_4\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$, látex de lipasas vegetales auto-soportadas de *Carica papaya* (CPL) y *Araujia sericifera* (ASL).

Catalizador	Relación molar Ác. Oleico: metanol	Actividad específica ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)		
		45 °C	65 °C	85 °C
HPA másico	1:1		0,00	1,10
18 % HPA/ TiO_2	1:1			6,40
$\text{Cs}_2\text{H}_4\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$	1:1			0,00
Mezcla mecánica	1:1			1,66
Novozym® 435	1:1		7,23	
Lipasa CPL	1:1	0,00		
	1:4	7,61		
Lipasa ASL	1:1	0,00		
	1:4	60,7		

La Tabla 1 muestra los resultados de actividad específica (micromoles convertidos de ácido oleico en función de la masa total de catalizador y el tiempo de reacción) obtenida para los materiales inorgánicos y enzimáticos. Se presentan valores de actividad específica, ya que al ser materiales catalíticos tan disímiles la normalización por la masa utilizada de catalizador permite comparar la actividad por miligramo de catalizador en el mismo tiempo de reacción. La esterificación catalizada con las lipasas CPL y ASL se realizó sola a 45 °C ya que a mayores temperaturas se produce la desnaturalización de las proteínas.

El biocatalizador comercial Novozym® 435 es activo a 65 °C que es la temperatura de reacción típica de la generación enzimática de biodiesel [3]. A diferencia de ese material enzimático, los catalizadores a base del ácido fosfotúngstico de Wells Dawson son activos a mayores temperaturas. El hecho que la sal de cesio coprecipitada no posea actividad en contraste con la mezcla mecánica que contiene el ácido evidencia que la acidez del mismo cumple un rol fundamental en la capacidad de estos materiales para catalizar la esterificación del ácido graso.

Estudios previos demostraron que las propiedades pseudo-líquidas del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson permiten el acceso de los reactivos al interior del material. En este sentido se ha comprobado que el ácido másico posee un número de sitios ácidos igual a 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ versus 3.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ del heteropoliácido soportado sobre dióxido de titanio [10]. El hecho que el ácido soportado 18 % $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}/\text{TiO}_2$ presenta una actividad mayor que el ácido másico sería una indicación de que la esterificación solo se produce en la superficie del material y no en condiciones pseudo-líquidas.

Las lipasas vegetales auto-soportadas CPL y ASL son activas a temperaturas inferiores al biocatalizador comercial (45 °C versus 65 °C) y requieren metanol en exceso (relación molar ácido graso: metanol igual a 1:4). La lipasa ASL mostró una actividad específica con un orden de magnitud superior a la CPL, el biocatalizador comercial y los materiales inorgánicos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos proveen indicios de que la lipasa ASL es una alternativa interesante en la síntesis de biodiesel por catálisis enzimática. Esta lipasa proviene de una especie vegetal autóctona y hasta la fecha se desconocen los componentes de la matriz insoluble que contiene la lipasa soportada naturalmente. Estas observaciones promueven la realización de nuevas investigaciones, a fin de evaluar si existe interferencia por parte de la matriz que contiene a la misma, así como un estudio más exhaustivo de las condiciones óptimas de reacción.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET (proyectos PIP 112 201301 00171 y PIP 0150) y a la Universidad Nacional del La Plata (proyectos 11-X626 y X682) por el apoyo financiero para la ejecución de esta investigación.

Referencias

- [1] S. Yan, C. DiMaggio, H. Wang, S. Mohan, M. Kim, L. Yang, S. O. Salley, K. Y. S. Ng, *Curr. Catal.* 1 (2012) 41-51.
- [2] A. Ansalme, E. F. Kozhevnikova, I. V. Kozhevnikov, *Appl. Catal. A: Gen.* 349 (2008) 170-176.
- [3] C. José, G. B. Austic, R. D. Bonetto, R. M. Burton, L. E. Briand, *Catal. Today* 213 (2013) 73-80.
- [4] UNE-EN 14104 Normativa española AENOR 2003. Productos derivados de aceites y grasas. Esteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del índice de acidez.
- [5] P. Di Santo Meztler, M. E. Fait, M. L. Foresti, S. R. Morcelle, *Cat. Sci. Technol.* 4 (2014) 1386-1394.
- [6] S. R. Matkovic, S. E. Collins, A. L. Bonivardi, M. A. Bañares, L. E. Briand, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 8097-8105.
- [7] S. R. Matkovic, G. M. Valle, L. E. Briand. *Actas del XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis*, Santa Fé, Argentina, trabajo PD62.
- [8] N. B. Nakkash, S. R. Al-Karkhi, *I.J.C.P.E.* 13(4) (2012) 13
- [9] S. Basumatary, D. C. Deka, *Der Chemica Sinica* 3(6) (2012) 1384-1393.
- [10] S. R. Matkovic, G. M. Valle, L. A. Gambaro, L. E. Briand, *Catal. Today* 133-135 (2008) 192-199.