



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral: Valorización de aceite comestible de  
desecho mediante catálisis heterogénea utilizando  
catalizadores enzimáticos e inorgánicos de naturaleza ácida**

---

**Tesista: Paula Stefanía Mateos**

**Directora: Laura E. Briand**

**Codirectora: Silvana R. Matkovic**

**Año: 2024**

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el **Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco” CINDECA**, dependiente de CONICET, de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires y de la Universidad Nacional de La Plata.

*A mi familia*

*A la memoria de mi abuelo Miguel*

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por permitirme realizar la Tesis doctoral.

A mi directora, la Dra. Laura Briand, por abrirme las puertas del CINDECA, por su dedicación, enseñanzas y acompañamiento en todo este tiempo, siempre impulsándome con su optimismo.

A mi codirectora, la Dra. Silvana Matkovic, por sus enseñanzas, contención y charlas de apoyo en estos años.

A mis compañeras Vicky, Carla y Sofi por la buena energía que siempre tienen, brindando un hermoso ambiente de trabajo. Por escucharme y aconsejarme cuando lo necesito.

A todos mis compañeros del CINDECA, en especial a Pablo y Gabriel que siempre están dispuestos a ayudarme y acompañarme con sus charlas de café.

A mis compañeros de la cátedra de Química Orgánica que siempre me escucharon y brindaron su amistad a lo largo de todo mi camino en la facultad.

A la Dra. Susana Morcelle por brindarme la lipasa ASL.

A la Dra. Mónica Casella por proporcionarme el equipo de cromatografía gaseosa y a la Dra. Marisa Navas y al Ing. Hernán Bideberripe por su colaboración con el uso de este equipo.

A la Dra. Fernanda Hamet por su ayuda en los primeros ensayos de este trabajo.

A la Dra. Claudia Ruscitti por desarrollar los gráficos de superficie de respuesta.

Al Dr. Sebastián Collins y a la Dra. Marta Bosco por recibirme en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) y por sus enseñanzas y acompañamiento brindado durante mi estadía en Santa Fe.

A la Sociedad Argentina de Catálisis (SACat) y a la Universidad Nacional de La Plata por los subsidios otorgados.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC) por las becas y financiamiento otorgado.

A mis padres y hermanos por el acompañamiento y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Por su esfuerzo para que pueda estudiar y su fe en mí.

A la familia Buldain que me alientan y acompañan en cada paso y siempre están dispuestos a ayudar cuando lo necesito.

A mis amigos, principalmente a Nati, Eli, Yeko y Pau, por todos los lindos momentos compartidos dentro y fuera de la facultad.

A Dani, mi compañero de vida, gracias por apoyarme y contenerme en todo momento. Y a mi cablecito a tierra, Benja, que siempre me saca una sonrisa. Gracias por la paciencia y aguantarme cuando estoy nerviosa, gracias por ser los mejores compañeros que podía tener.

Muchas gracias a todos

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	3
1.1 REVALORIZACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN .....	4
1.1.1 Composición de los aceites vegetales .....	4
1.1.2 Consumo y desecho de aceites vegetales .....	4
1.1.3 Contaminación provocada por el descarte inadecuado del aceite vegetal usado .....	5
1.1.4 Reutilización de aceite vegetal usado .....	6
1.2 PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES .....	6
1.2.1 Metodología convencional para generar biodiesel .....	7
1.2.2 Metodología eco-compatible para la síntesis de biodiesel .....	8
1.2.3 Producción de biodiesel en Argentina.....	9
1.3 CATÁLISIS ÁCIDA HETEROGÉNEA .....	10
1.3.1 Estructura de los Heteropoliácidos .....	11
1.3.2 Actividad catalítica de los heteropoliácidos en la esterificación de ácidos grasos y transesterificación de aceite .....	14
1.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA .....	16
1.4.1 Actividad catalítica del biocatalizador Eversa® Transform .....	17
1.4.2 Actividad catalítica del látex de <i>Araujia sericifera</i> .....	18
1.5 OBJETIVOS DE LA TESIS.....	19
1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
<b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS CATALÍTICOS ENZIMÁTICOS</b> .....	31
2.1. LIPASA VEGETAL <i>Araujia sericifera</i> ASL .....	32
2.1.1. Antecedentes .....	32
2.1.2 Preparación del látex de <i>Araujia sericifera</i> .....	33
2.1.3 Caracterización del látex de <i>Araujia sericifera</i> .....	35
2.1.3.1 Determinación de la actividad hidrolítica .....	35
2.1.3.2 Determinación de la actividad catalítica de ASL en la síntesis de ésteres de ácidos grasos	36
2.2. BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM .....	37
2.2.1. Antecedentes .....	37
2.2.2. Preparación y caracterización del biocatalizador .....	37
2.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
<b>CAPÍTULO 3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS FOSFOTÚNGSTICOS CON ESTRUCTURA WELLS-DAWSON</b> .....	41
3.1 SÍNTESIS Y DISPERSIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS FOSFOTÚNGSTICOS DE ESTRUCTURA WELLS-DAWSON .....	42

3.1.1 Síntesis del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson y las heteropolisales máxicas .....	42
3.1.2 Síntesis del HPA soportado sobre dióxido de titanio TiO <sub>2</sub> .....	43
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES.....	44
3.2.1 Espectroscopia FTIR.....	44
3.2.1.1 Fundamento .....	44
3.2.1.2 FTIR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.....	48
3.2.1.3 Caracterización del ácido fosfotúngstico de Wells Dawson máxico y soportado por espectroscopia infrarroja .....	50
3.2.2 Determinación de la superficie específica por el método BET .....	50
3.2.2.1 Fundamento .....	50
3.2.2.2 Teoría de Langmuir.....	51
3.2.2.3 Modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET) .....	51
3.2.3 Investigación de la naturaleza y concentración de sitios ácidos por adsorción de piridina .....	53
3.2.4 Análisis termogravimétrico .....	55
3.2.5 Microscopía electrónica de barrido y microanálisis por dispersión de energías de rayos-X.....	58
3.2.5.1 Fundamento .....	59
3.2.5.2 Preparación de la muestra .....	63
3.2.5.3 Microanálisis elemental por dispersión de energías de rayos-X.....	64
3.2.6 Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo .....	65
3.2.6.1. Fundamento .....	65
3.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
<b>CAPÍTULO 4. METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LAS REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN Y TRANSESTERIFICACIÓN Y EN EL ANÁLISIS CUALI Y CUANTITATIVO DE LOS REACTIVOS Y PRODUCTOS .....</b>	<b>72</b>
4.1 ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO .....	73
4.1.1 Reacciones de esterificación con heteropolicompuestos .....	73
4.1.2 Reacciones de esterificación con heteropoliácido soportado .....	74
4.2 TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE VEGETAL FRESCO Y USADO EN COCCIÓN.....	75
4.2.1 Estudio de la reacción de transesterificación de aceite de girasol usado en cocción catalizada con el ácido fosfotúngstico de estructura Wells Dawson .....	75
4.2.2 Reacciones de transesterificación de aceite usado catalizadas con el biocatalizador comercial Eversa® Transform.....	76
4.2.3 Estudio de la actividad catalítica de la lipasa presente en el látex de la planta <i>Araujia sericifera</i> en la reacción de transesterificación de aceite usado en cocción.....	77

4.2.4 Estudio de la actividad catalítica de la lipasa presente en el látex de la planta <i>Araujia sericifera</i> en las reacciones secuenciales de hidrólisis y posterior esterificación de aceite usado en cocción utilizando diferentes alcoholes.....	78
4.2.4.1 Actividad catalítica de la lipasa ASL en la hidrólisis de aceite usado en cocción.....	78
4.2.4.2 Estudio de la reutilización de la lipasa ASL en la hidrólisis .....	79
4.2.4.3 Esterificación de los ácidos grasos libres generados a partir de la hidrólisis del aceite .....	80
4.2.5 Investigación de la reacción de transesterificación en dos etapas utilizando una combinación de los biocatalizadores ASL y comercial Eversa® Transform .....	80
4.3 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA .....	82
4.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ .....	82
4.5 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA .....	83
4.5.1 Fundamento .....	83
4.5.2 Análisis del aceite y de los productos de reacción mediante cromatografía gaseosa	87
4.5.3 Asignación de las señales del análisis cromatográfico de glicéridos, ácidos grasos y ésteres .....	89
4.5.4 Cuantificación de glicéridos.....	99
4.6 ANÁLISIS DE GLICEROL LIBRE.....	101
4.6.1 Método analítico volumétrico.....	101
4.6.2 Cálculo indirecto de glicerol mediante datos obtenidos del análisis cromatográfico .....	102
4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS CATALIZADORES .....	102
4.8. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS A TRAVÉS DE ALGORITMOS NO-LINEALES: OBTENCIÓN DE SUPERFICIES DE RESPUESTA .....	103
4.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO UTILIZANDO COMO CATALIZADORES HETEROPOLICOMPUESTOS DE WELLS-DAWSON .....</b>	<b>107</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS.....	108
5.1.1. Análisis termogravimétrico: determinación de la fórmula molecular del HPA .....	108
5.1.2. Análisis molecular por espectrofotometría infrarroja: investigación de la estructura del heteropolianión fosfotúngstico $P_2W_{18}O_{62}^{-6}$ .....	110
5.1.3. Análisis por microscopia electrónica de barrido y microsonda de electrones: estudio textural y de la dispersión del HPA sobre $TiO_2$ .....	111
5.1.4. Determinación de la superficie específica por el método BET .....	113
5.2 INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO UTILIZANDO COMO CATALIZADORES HETEROPOLICOMPUESTOS .....	115
5.2.1 Estudio preliminar de la actividad catalítica de los heteropolicompuestos con estructura del tipo Wells Dawson .....	115

5.2.2. Investigación de la actividad catalítica del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson másico y soportado en la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol .....	116
5.2.3 Estudio de las condiciones óptimas de la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol utilizando como catalizador 42% p/p HPA/TiO <sub>2</sub> .....	118
<b>5.3. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN UTILIZANDO COMO CATALIZADOR ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO DE WELLS-DAWSON SOPORTADO .....</b>	<b>123</b>
5.3.1 Investigación de la actividad catalítica de 42% p/p HPA/TiO <sub>2</sub> en la transesterificación de aceite vegetal usado .....	123
5.3.2 Ensayos de reutilización del catalizador 42% HPA/TiO <sub>2</sub> en la transesterificación de aceite usado .....	127
<b>5.4 ESTABILIDAD DEL HETEROPOLIÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO DE WELLS-DAWSON SOPORTADO .....</b>	<b>129</b>
5.4.1 Estudio de estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO <sub>2</sub> en la esterificación de ácido oleico .....	129
5.4.2 Estudio de estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO <sub>2</sub> en la transesterificación de aceite usado en cocción .....	130
5.5 CONCLUSIONES .....	132
5.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	133
<b>CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE UTILIZANDO EL BIOCATALIZADOR EVERSA® TRANSFORM .....</b>	<b>135</b>
6.1 ANÁLISIS DE LOS MEDIOS DE REACCIÓN .....	136
6.1.1 Estudio de las fases de los medios de reacción .....	136
6.1.2 Distribución de glicéridos en el sistema trifásico de reacción .....	141
6.2 ESTUDIO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN USANDO EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM .....	142
6.2.1 Efecto de la relación molar aceite: alcohol y de la cantidad de biocatalizador .....	142
6.2.2 Efecto de la naturaleza del alcohol y del agregado de agua .....	146
6.3 REUSO DEL BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM .....	149
6.4 CONCLUSIONES .....	150
6.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	151
<b>CAPÍTULO 7 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA LIPASA VEGETAL PROVENIENTE DE ARAUJIA SERICIFERA EN LA HIDRÓLISIS, ESTERIFICACIÓN Y TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE VEGETAL .....</b>	<b>154</b>
7.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA VEGETAL ASL EN LA HIDRÓLISIS DE ACEITE USADO EN COCCIÓN .....	155
7.1.1 Influencia del agua agregada y la cantidad de biocatalizador .....	155
7.1.2. Influencia de la cantidad de enzima y la temperatura .....	157
7.1.3 Influencia de la temperatura y el tiempo de reacción .....	158

7.1.4 Influencia del agregado de un co-solvente orgánico .....	159
7.2. ESTUDIO MOLECULAR DE LA HIDRÓLISIS DE ACEITE USADO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA .....	161
7.3 ESTUDIO DE LA HIDRO-ESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN CATALIZADA CON LA ENZIMA VEGETAL DE <i>Araujia Sericifera</i> .....	164
7.3.1 Influencia del tiempo de reacción y naturaleza del alcohol .....	165
7.3.2 Efecto de la remoción del agua y cantidad de alcohol .....	169
7.4 COMPARACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DIRECTA Y LA HIDRO-ESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO .....	171
7.5 REUTILIZACIÓN DE LA LIPASA DEL LÁTEX DE <i>Araujia sericifera</i> .....	173
7.6 TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE USADO UTILIZANDO LA COMBINACIÓN DE LIPASAS DE ORIGEN VEGETAL Y FÚNGICO .....	174
7.7 CONCLUSIONES .....	178
7.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	179
<b>CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>ANEXOS</b> .....	185
ANEXO 1 .....	186
ANEXO 2 .....	188
ANEXO 3 .....	192
ANEXO 4 .....	195
<b>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS</b> .....	198

## **RESUMEN**

En este trabajo de Tesis doctoral se presenta la investigación del uso de catalizadores inorgánicos y enzimáticos como alternativa prometedora en las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación catalíticas de aceite usado en cocción. Los materiales inorgánicos estudiados fueron el heteropoliácido fosfotúngstico con estructura Wells-Dawson másico y dispersado sobre dióxido de titanio, así como también sus sales de manganeso y níquel. Por otro lado, los catalizadores enzimáticos investigados fueron el biocatalizador comercial Eversa® Transform y la fracción insoluble del látex presente en los frutos de *Araujia sericifera* una planta autóctona que se indicará como ASL.

Este trabajo se encuentra dividido en siete Capítulos cuyo contenido se describe a continuación.

El **Capítulo 1** corresponde al marco teórico y antecedentes de la temática de esta investigación. Contiene información acerca del consumo, descarte y reutilización de aceite usado en cocción, sobre la metodología convencional para generar biodiesel y sus alternativas eco-compatibles. Adicionalmente, se discuten las investigaciones acerca de la actividad catalítica de los heteropolicompuestos y los biocatalizadores en la esterificación de ácidos grasos libres y en la transesterificación de aceite. Por último, en este capítulo se exponen los objetivos de este trabajo.

En el **Capítulo 2** se presenta información general acerca de los catalizadores enzimáticos Eversa® Transform y ASL, así como información sobre su obtención y caracterización.

En el **Capítulo 3** se presenta la metodología de síntesis de los materiales fosfotúngsticos con estructura Wells-Dawson y los fundamentos teóricos de las técnicas de caracterización de materiales.

En el **Capítulo 4** se describen los procedimientos y las condiciones de reacción en las que se realizaron las esterificaciones de ácido oleico y las transesterificaciones de aceite de desecho con los diferentes catalizadores investigados. Adicionalmente, se presentan

los fundamentos teóricos del análisis de los reactivos y productos, y una exhaustiva evaluación de las señales de los análisis cromatográficos.

En el **Capítulo 5** se presentan los resultados de la actividad específica de diversos heteropolímeros con estructura de tipo Wells-Dawson. Se utilizó como reacción test la esterificación de ácido oleico para seleccionar los sistemas catalíticos más promisorios. Adicionalmente, en este Capítulo se discute la caracterización del heteropolímero de Wells-Dawson soportado sobre dióxido de titanio, la actividad catalítica en la transesterificación de aceite usado con metanol y el reuso del material.

En el **Capítulo 6** se presenta la investigación del uso del biocatalizador comercial Eversa® Transform en la transesterificación del aceite comestible usado y la metodología de muestreo utilizado para el sistema complejo de reacción. En particular, se presenta el estudio del uso de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol en la transesterificación y se discute la influencia de la naturaleza de los mismos. Así mismo, se optimizan las condiciones de reacción mediante el estudio de la relación molar aceite: alcohol, el agregado de agua y la cantidad de biocatalizador. Por otro lado, se evaluó el aislamiento y reuso del biocatalizador.

En el **Capítulo 7** se presentan los resultados del estudio de la hidro-esterificación y transesterificación de aceite usado con la lipasa presente en la fracción insoluble del látex proveniente de la especie nativa *Araujia sericifera*. Se investigaron diferentes condiciones de reacción como la temperatura, el tiempo de reacción, la cantidad de biocatalizador, la influencia del agregado de agua y de un co-solvente, y la agitación en la hidrólisis de aceite. Asimismo, se investigó el efecto del uso de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, la relación molar aceite: alcohol, el tiempo de reacción y el agregado de agua en la esterificación y transesterificación post hidrólisis enzimática. En este Capítulo también se discuten los resultados del aislamiento y reuso del biocatalizador, como también, la combinación de los biocatalizadores enzimáticos estudiados en esta Tesis.

Finalmente, se presenta una sección de conclusiones finales de este trabajo.

# **CAPÍTULO 1**

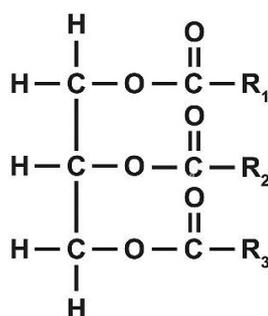
## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## 1.1 REVALORIZACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN

### 1.1.1 Composición de los aceites vegetales

Los aceites vegetales que se utilizan para cocinar se obtienen a partir de semillas o frutos oleaginosos. Están constituidos principalmente por triglicéridos, que son ésteres de glicerol con tres ácidos grasos (Figura 1.1), siendo la mayoría de estos mixtos, es decir, con 2 o 3 de sus ácidos grasos diferentes (Sanz Tejedor, s.f.).



**Figura 1.1** Estructura molecular de los triglicéridos. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cadenas de hidrocarburos saturadas e insaturadas.

Los ácidos grasos que forman parte de estos triglicéridos son principalmente el ácido linoleico, oleico, esteárico, palmítico, láurico, linolénico, mirístico, entre otros. Dentro de estos ácidos grasos hay saturados e insaturados y contienen entre 12 y 18 átomos de carbono.

### 1.1.2 Consumo y desecho de aceites vegetales

Los aceites que mayormente se consumen a nivel mundial son el aceite de palma, soja, colza, girasol, almendra de palma, algodón, maní, maíz, oliva, coco y sésamo (Sigaudó & Terre, 2018). En particular, los aceites más utilizados para consumo doméstico en Argentina son el de girasol y soja, y según la Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR), este aceite es el elegido por el 60-70% de las familias para cocinar (Agrofy, 2016). Además, de acuerdo a la Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina (CIARA), el consumo total de aceites solo en la ciudad de Buenos Aires supera los 61 millones de litros al año. El consumo de aceite vegetal anual en el país es de 20,3

litros por persona, de los cuales casi el 20% es utilizado en los hogares para fritura, según un relevamiento realizado por la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires Ciudad, s.f.; Agrositio, 2022). Este reporte también muestra que más de la mitad de los hogares que consumen aceite lo descartan inadecuadamente después de su uso. Solo un 22% de este residuo es recuperado de forma regular, el 25% lo hace ocasionalmente y un 53% nunca recupera el aceite luego de utilizarlo para freír. Estos datos suponen un descarte de 2,5 litros por persona al año, por lo tanto, se estarían desechando entre 60 y 90 millones de litros de aceite. Por otra parte, los locales gastronómicos generan un promedio de 937 litros de aceite de desecho al año. En el país hay aproximadamente 66.000 locales de este tipo por lo que se producirían unos 62 millones de litros y se estima que un 80% de este es reciclado a través de empresas dedicadas a recuperar el aceite (ElDiarioAr, 2023).

### **1.1.3 Contaminación provocada por el descarte inadecuado del aceite vegetal usado**

Es bien conocido que el aceite vegetal usado que se descarta de manera inadecuada genera efectos negativos en el medioambiente. En este contexto, el vertido de aceite en el suelo genera el deterioro del humus, la disminución de la fertilidad de la tierra y causa problemas de oxigenación, afectando a los sistemas bióticos. El descarte del aceite a través de los desagües conduce al deterioro de tuberías ya que entra en contacto con sustancias que se encuentran en éstas generando bolas de grasa, lo que provoca obstrucciones. Asimismo, al continuar el recorrido, el aceite desemboca finalmente en arroyos, ríos y canales contaminando estos cursos de agua e incluso los mares. El aceite forma una película en la superficie del agua, con la cual es inmisible, lo que dificulta el intercambio gaseoso, afectando a los seres vivos presentes en el agua (National Geographic, 2024; Universidad Nacional de La Plata, 2024). Cada litro de aceite puede contaminar 1000 litros de agua (Moya-Salazar et al., 2020). Otras consecuencias que trae aparejado el descarte inapropiado del aceite usado en cocción es la aparición de plagas en los hogares, así como también el incremento de costos de operación del agua en las plantas de aguas residuales y el mantenimiento de las mismas (Bertini, 2021). El aceite se adhiere a las paredes de las tuberías municipales, pluviales y de saneamiento y, además de provocar obstrucciones, disminuye el caudal de evacuación de agua y puede provocar inundaciones (RBA Ambiental, s.f.).

### **1.1.4 Reutilización de aceite vegetal usado**

A nivel mundial, se estima que anualmente se generan 190 millones de toneladas métricas de aceite vegetal usado en cocción (Manu et al., 2020). Este gran volumen de desechos, sumado a los problemas de contaminación que provoca el descarte inadecuado, evidencian la importancia de investigar y desarrollar nuevas tecnologías para el tratamiento y eventual valorización del aceite usado.

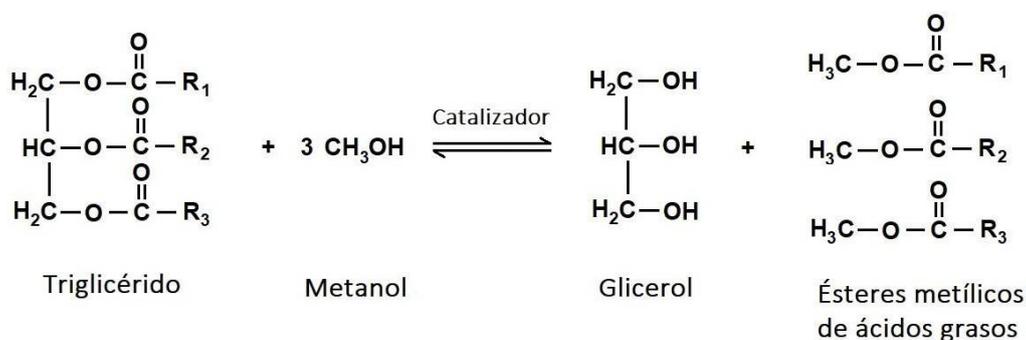
Este aceite puede ser tratado y utilizado para la generación de una gran variedad de productos con valor agregado tales como: biodiesel, biogás, biocarburantes, ceras, barnices, jabones, velas, etc. En particular, la producción de biodiesel a partir de aceite de cocina usado merece especial atención ya que genera un ahorro de un 96% de la energía fósil respecto a la producción del diésel (González Canal et al., 2015).

### **1.2 PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES**

El diésel es un combustible derivado del petróleo con un enorme uso a nivel mundial. Sin embargo, debido al inminente agotamiento de las reservas fósiles, las investigaciones sobre la generación de combustibles alternativos han ganado gran interés en los últimos años. Por otra parte, el Protocolo de Kioto exige reducir las emisiones de los 6 principales gases de efecto invernadero, los cuales son dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos y hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ), que son generados principalmente por el uso de combustibles fósiles. Este contexto global, ha llevado al aumento en el uso de biocombustibles como el biodiesel, el cual es un combustible renovable que genera menores emisiones de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera (Arismendi Londoño et al., 2021). Además, presenta numerosas ventajas frente al diésel derivado del petróleo ya que no produce emisiones gaseosas azufradas, es biodegradable, ha demostrado mejorar el funcionamiento de los vehículos y, debido a que su punto de inflamación es superior a  $110^\circ\text{C}$ , su transporte y almacenamiento es más seguro.

### 1.2.1 Metodología convencional para generar biodiesel

El biodiesel se produce a partir de aceites vegetales o grasas animales y puede ser mezclado con el diésel en diferentes proporciones, así como también utilizarse en estado puro. Este biocombustible está formado por ésteres de ácidos grasos y habitualmente es producido mediante la transesterificación de aceite vegetal, como el aceite de soja, girasol, algodón, canola, colza y palma. Estos aceites, como se vio en la Sección 1.1.1, están constituidos principalmente por triglicéridos, los cuales al reaccionar con alcoholes de cadena corta en presencia de un catalizador forman glicerol y ésteres de ácidos grasos (biodiesel), como se presenta en la Figura 1.2. Es así que por cada kg de aceite podría obtenerse entre 0,92 y 0,97 kg del biocombustible.



**Figura 1.2.** Reacción de síntesis de biodiesel

El alcohol más utilizado para esta reacción es el metanol y los catalizadores más empleados en la industria de la generación del biocombustible son los catalizadores básicos homogéneos, tales como el hidróxido de sodio y de potasio (NaOH y KOH). Si bien este método tiene la ventaja de utilizar un catalizador económico, también presenta una serie de desventajas debido a que el biodiesel crudo es lavado con agua para remover los restos de hidróxido generando un gran volumen de desechos acuosos alcalinos (Santori et al., 2012; Banerjee et al., 2009). Por otro lado, esta técnica requiere el uso de aceites refinados, es decir, estos deben recibir tratamientos para eliminar la humedad y los ácidos grasos libres, para así evitar la reacción de saponificación y la desactivación del catalizador (Torres Rivero et al., 2017). La utilización de aceites pretratados y con bajos índices de acidez representa entre el 70 y 95% del total del costo del proceso de producción de biodiesel, por este motivo, se estudia

exhaustivamente el uso de materias primas como el aceite de cocina usado en cocción. El mismo, entra nuevamente en la cadena productiva, disminuye el costo de la producción del biodiesel, y también reduce el descarte inadecuado del aceite, que si no, se convertiría en un compuesto contaminante. De esta manera, dentro de este proceso da lugar a un biocombustible de segunda generación (Fan et al., 2012; Mibielli et al., 2019).

### **1.2.2 Metodología eco-compatible para la síntesis de biodiesel**

Siguiendo el modelo Economía Circular, definido como: “un modelo de producción y consumo que implica compartir, alquilar, reutilizar, reparar, renovar y reciclar materiales y productos existentes todas las veces que sea posible para crear un valor añadido. De esta forma, el ciclo de vida de los productos se extiende”; en los últimos años se ha generado una tendencia a la búsqueda en la reutilización de residuos como el aceite usado (Da Costa Pimienta, 2022). En este contexto, la utilización del mismo para generar biodiesel es una forma de aprovechar un residuo para transformarlo en un bio-producto con un gran valor agregado, contribuyendo al cuidado del medioambiente.

Teniendo en cuenta esta información, la generación de biodiesel a partir de aceite vegetal usado cumple con algunos de los Principios de la Química Verde, los cuales fueron establecidos en 1998 por Paul Anastas y John Warner con el fin de desarrollar procesos químicos más sostenibles (Anastas & Warner, 1998). Los mismos son:

- 1) Prevención de residuos, este principio busca evitar la generación de residuos en la medida que sea posible.
- 2) Economía atómica, enfocada en diseñar métodos de síntesis que maximicen la eficiencia de los átomos presentes en los reactivos para formar el producto deseado.
- 3) Metodologías de síntesis de toxicidad reducida, usando métodos de síntesis en los que se minimice el uso de reactivos y productos químicos peligrosos.
- 4) Diseño de compuestos químicos más seguros, estos deben diseñarse para preservar su eficacia de la función y reducir la toxicidad.
- 5) Disminución del uso de sustancias auxiliares, evitando, minimizando o reemplazando el uso de solventes, agentes de separación, etc.
- 6) Eficiencia energética, principio centrado en disminuir el uso de energía realizando

las síntesis a temperatura y presión ambiente siempre que sea posible.

7) Utilización de materias primas renovables, en lugar de recursos no renovables.

8) Reducción de derivados, para ellos se debe evitar o minimizar las derivatizaciones como protección y desprotección de grupos, las cuales implican el uso de reactivos adicionales y una mayor generación de residuos.

9) Potenciación de la catálisis, con el objetivo de aumentar la eficiencia de las reacciones químicas y reducir la cantidad de reactivos y energía requerida.

10) Diseño de productos biodegradables, sintetizando productos que se degraden en productos inocuos al ser eliminados y no persistan en el ambiente.

11) Desarrollo de técnicas para análisis en tiempo real, lo que permite monitorear el proceso y evitar la formación de sustancias peligrosas.

12) Minimizar el potencial de accidentes químicos, eligiendo materiales con menor riesgo de accidentes como emanaciones e incendios (Zapien-Gómez et al., 2023; Palermo, 2012).

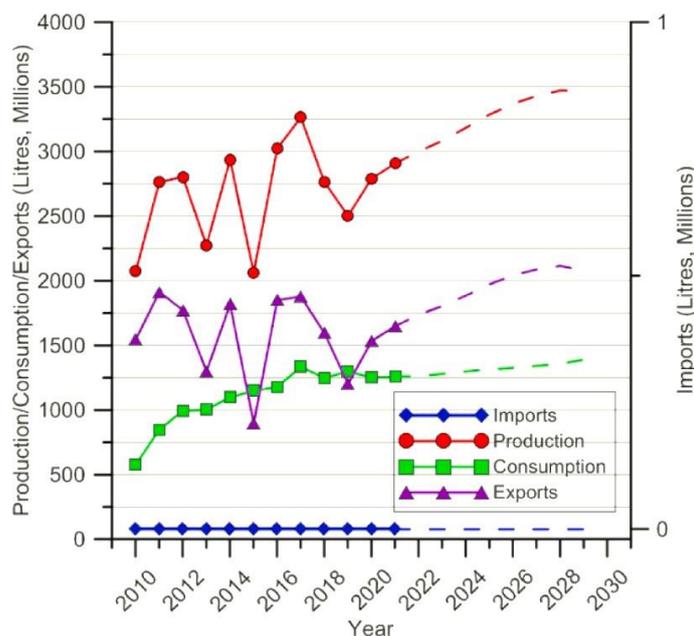
Si bien la aplicación de todos los principios en simultáneo no siempre es posible, se recomienda llevar a cabo procesos que cumplan con la mayor cantidad de estos principios.

### **1.2.3 Producción de biodiesel en Argentina**

La Ley de Biocombustibles del año 2006 estableció la obligación de mezclar una proporción de biodiesel con gasoil lo que aumentó la demanda interna (Pierri & Julianello, 2019). En la actualidad, el corte obligatorio de biodiesel es de un 5% según la Ley de biocombustibles 27.640 que sancionó el Congreso Nacional en agosto de 2021.

La Figura 1.3 muestra un balance de la industria del biodiesel en Argentina en los últimos años, donde se detallan las toneladas de biodiesel producido, consumido, importado y exportado en el país anualmente, así como también su proyección a futuro. Como se puede ver, la producción de biodiesel en Argentina depende en gran parte de las exportaciones, y la mayor parte de este biocombustible se exporta a Países Bajos, Malta, Bélgica y Canadá (de Souza et al., 2022). De acuerdo a un informe estadístico presentado por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE) se prevé que la producción de biocombustibles aumentará de manera significativa en los

próximos 10 años. Argentina es uno de los países que lidera la producción de biodiesel en el mundo, ubicándose en el puesto número 6 en el año 2023, luego de la Unión Europea, Estados Unidos, Indonesia, Brasil y China (OCDE iLibrary, 2023).



**Figura 1.3.** Balance anual de la industria de biodiesel en Argentina  
(de Souza et al., 2022)

Según un informe publicado por el sitio digital de noticias denominado “Aire de Santa Fe”, Argentina cuenta con 33 plantas productoras de biodiesel de las cuales la mitad se encuentran ubicadas en la provincia de Santa Fe (16) y el resto en Buenos Aires (11), Entre Ríos (3), La Pampa (2) y San Luis (1) (Pampa Gringa, 2024). Estas fábricas cuentan con una capacidad de 3,5 millones de toneladas para la producción de biodiesel y la materia prima más utilizada es el aceite de soja (Demeco et al., 2021). Por este motivo, es importante diversificar las materias primas para hacerle frente a la demanda de biodiesel sin poner en riesgo la industria alimenticia, asegurando la disponibilidad de aceite de soja para el consumo como alimento (Nikas et al., 2022).

### 1.3 CATÁLISIS ÁCIDA HETEROGÉNEA

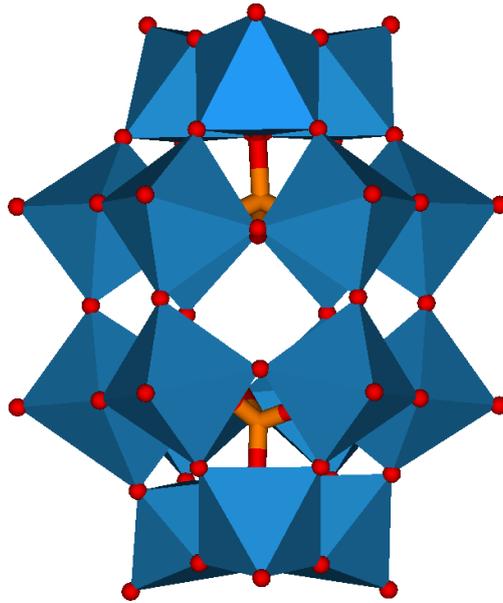
Es sabido que los catalizadores heterogéneos mejoran el proceso de transesterificación eliminando los costos de procesamiento y reduciendo la generación

de contaminantes, ya que minimizan el gasto energético y el uso de solventes orgánicos. Asimismo, pueden ser separados de manera más sencilla del medio de reacción facilitando su reutilización, lo que conduce a un proceso ecológico y rentable (Avila, 2020; Bohigues Vallet, 2021).

### 1.3.1 Estructura de los Heteropoliácidos

Los compuestos del tipo polioxometalatos y heteropoliácidos (HPA) poseen una amplia aplicación como catalizadores en reacciones homogéneas y heterogéneas en fase líquida y gaseosa, en reemplazo de ácidos inorgánicos como  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ , entre otros. (Esmi et al., 2022; Sani et al., 2014). La estructura básica de los heteropolianiones consiste en un átomo central  $\text{X}^{n+}$  de fósforo(V), arsénico(IV) o azufre(VI), rodeado por estructuras de geometría octaédrica constituidas por un metal y átomos de oxígeno  $\text{MO}_6$ , donde el metal puede ser: molibdeno(VI), tungsteno(VI) o una mezcla de elementos. Estos metales pueden sustituirse parcialmente por otros elementos como: vanadio, lantánidos, metales de transición, halógenos y radicales inorgánicos (Briand et al., 2003; Park et al., 2008). A su vez el heteropolianión, está asociado a contracciones inorgánicas (protones, metales alcalinos, etc.) u orgánicas, formando materiales híbridos.

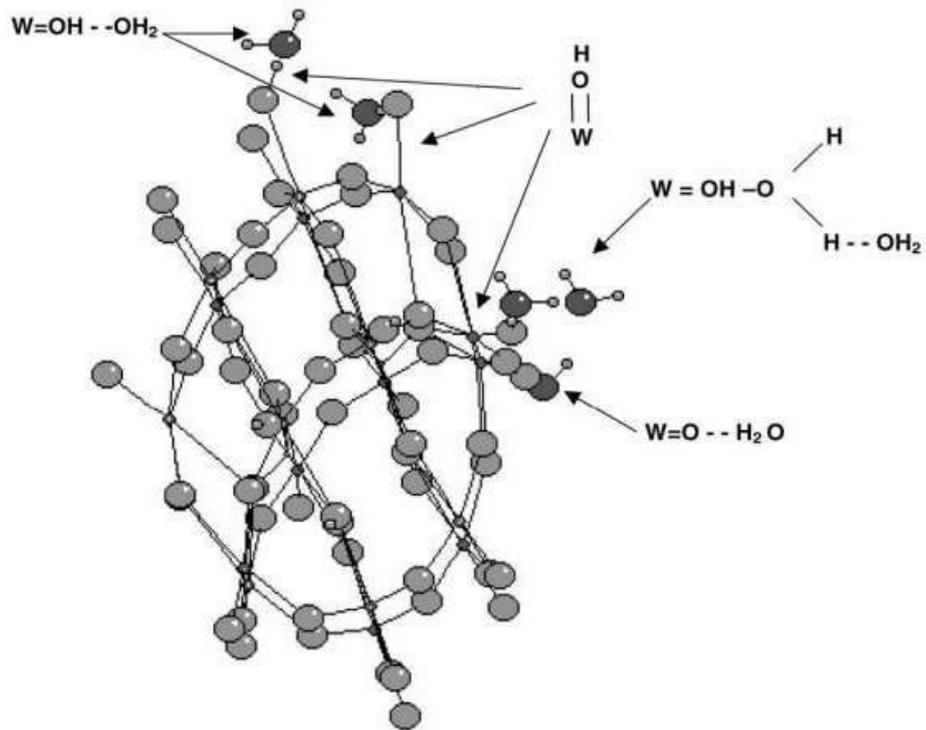
Los heteropoliácidos más estudiados son los que tienen estructura de tipo Keggin, los cuales están constituidos por heteropolianiones que presentan una estructura de tipo  $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{-n}$  con un átomo central X como  $\text{Si}^{+4}$  o  $\text{P}^{+5}$ , y un ion metálico M, generalmente  $\text{W}^{+6}$  o  $\text{Mo}^{+6}$ . Otros heteropolioxoaniones estudiados, aunque en menor medida, son los de Wells-Dawson, cuya estructura se representa como  $[\text{X}_2\text{M}_{18}\text{O}_{62}]^{-n}$  y se muestra en la Figura 1.4 (Briand et al., 2003; García-López et al., 2019). En ambos casos, los heteropolianiones que contienen protones como contracción, forman heteropoliácidos.



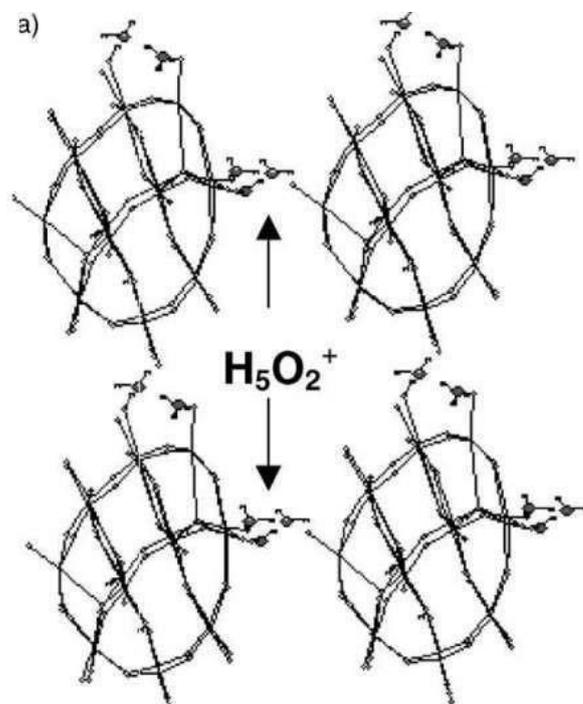
**Figura 1.4.** Representación del heteropolianión de Wells-Dawson  
(García-López et al., 2019)

Los heteropolíácidos presentan tres niveles de estructura:

- Estructura primaria: la cual corresponde a la estructura constitutiva básica del heteropolianión que se describió anteriormente.
- Estructura secundaria: se refiere a la disposición tridimensional de los heteropolianiones como estructuras iónicas. Los aniones se encuentran conectados por puentes de hidrógeno con moléculas de agua y protones  $H^+(H_2O)_2$  (o moléculas orgánicas) como se observa en las Figuras 1.5 y 1.6. La estructura secundaria es flexible dependiendo del contracción y de la estructura del heteropolianión. Esta propiedad permite que los heteropolícompuestos sólidos actúen como catalizadores tanto a nivel superficial como másico (Misono, 2001).
- Estructura terciaria: representa la manera en la cual la estructura secundaria se ensambla en partículas sólidas. Este grado estructural se relaciona con propiedades tales como el tamaño de partícula, superficie específica y distribución de tamaño de los poros de los heteropolianiones (Misono, 2001; Mizuno & Misono, 1998; Sambeth et al., 2003).



**Figura 1.5.** Heteropoliánion asociado a moléculas de agua y protones en el heteropoliácido de estructura Wells-Dawson (Sambeth et al., 2003).



**Figura 1.6.** Estructura secundaria del heteropoliácido fosfotúngstico de estructura Wells-Dawson  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O$  (Sambeth et al., 2003).

### 1.3.2 Actividad catalítica de los heteropoliácidos en la esterificación de ácidos grasos y transesterificación de aceite

Los heteropoliácidos presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores líquidos ácidos convencionales, cuyo manejo, contención, eliminación y la dificultosa regeneración, conduce a problemas ambientales. Además, la actividad catalítica de los HPA no se ve afectada por la presencia de agua como suele suceder con otros materiales catalíticos (Esmi et al., 2022; Orege et al., 2022).

Los sitios ácidos de los catalizadores sólidos heterogéneos se pueden clasificar en dos tipos: los de Brønsted, los cuales donan protones, y los sitios ácidos de Lewis, que aceptan electrones (Su & Guo, 2014; Gupta et al., 2020). La reacción de esterificación es favorecida en presencia de sitios ácidos de Brønsted mientras que la transesterificación por los sitios ácidos de Lewis (Gaurav et al., 2019; Narenji-Sani et al., 2020). Por lo tanto, en un proceso que involucra reacciones de esterificación y transesterificación es conveniente utilizar un catalizador que posea ambos tipos de sitios ácidos (Zhang et al., 2020). En este contexto, los HPA se han estudiado en este tipo de reacciones, ya que poseen una fuerte acidez de Brønsted, así como también sitios ácidos de Lewis (Ullah et al., 2016).

A pesar de las múltiples ventajas que presentan los heteropoliácidos, su alta solubilidad en agua y en disolventes polares, así como su baja área superficial, limitan su aplicación como catalizadores heterogéneos. Por lo tanto, se ha investigado su dispersión sobre óxido de silicio, trióxido de aluminio, dióxido de titanio, carbón activado, zeolitas, polímeros, entre otros. Los materiales soportados tienen alta estabilidad térmica y mecánica, y gran volumen de poros proporcionando una alta superficie (Pasquale et al., 2012; <sup>b</sup>Zhang et al., 2020, Esmi et al., 2022).

Los HPA más ampliamente investigados como catalizadores en reacciones de esterificación y transesterificación han sido los de estructura de tipo Keggin, como  $H_3PW_{12}O_{40}$  y  $H_4SiW_{12}O_{40}$ . Estos conducen a conversiones entre 77 y 86% en la reacción de esterificación del ácido hexanoico y en la transesterificación de propionato de etilo y hexanoato de etilo con metanol a 60°C en 6 horas (Ansalme et al., 2008). El heteropoliácido  $H_3PW_{12}O_{40} \cdot 6H_2O$  mostró ser eficiente en la esterificación de ácido palmítico y en la transesterificación de aceite usado en cocción y su actividad no se vio

afectada de manera considerable por el contenido de ácidos grasos libres y humedad (Cao et al., 2008). Posteriormente, Sepúlveda y colaboradores estudiaron la esterificación del ácido oleico con metanol y  $H_3PW_{12}O_{40}$  obteniendo una conversión del 80% en 10 h a 25°C y 50% en 2 horas al aumentar la cantidad de catalizador (Sepúlveda et al., 2011).

Por otra parte, se investigó la actividad de estos materiales soportados con el fin de llevar a cabo una catálisis heterogénea. Los heteropoliácidos de estructura Keggin inmovilizados en SBA-15, como:  $H_3PW_{12}O_{40}/SBA-15$ ,  $H_4SiW_{12}O_{40}/SBA-15$  y  $H_3PMo_{12}O_{40}/SBA-15$  catalizaron la esterificación de ácido palmítico con metanol a 60°C en 6 horas, con conversiones de 92%, 57% y 45% respectivamente (Tropecêlo et al., 2010). La literatura también reporta la investigación de la actividad catalítica del heteropoliácido tungstosilícico de estructura Keggin  $H_4SiW_{12}O_{40}$  soportado en un contenido de 30% sobre zeolita H $\beta$ . Este material catalizó la esterificación de ácido oleico y la transesterificación de aceite de soja con metanol, alcanzando conversiones de 86% y 95%, respectivamente. Las condiciones óptimas encontradas fueron una relación molar ácido oleico: alcohol de 1:20 y 100 mg de catalizador cada 0,01 moles de ácido oleico a 60°C durante 10 h, para la esterificación del ácido graso. Mientras que la transesterificación del aceite, se realizó con una relación molar de aceite: alcohol igual a 1:4, 200 mg de catalizador a 65°C durante 8 h de reacción (Narkhede & Patel, 2013).

El heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O$  ha demostrado tener múltiples aplicaciones como catalizador reciclable en reacciones que involucran catalizadores con propiedades ácidas y redox. Sin embargo, hasta la fecha las investigaciones reportadas sobre el uso de este heteropolicompuesto en síntesis de biodiesel son escasas (Briand et al., 2003; Ruiz et al., 2022).

En este sentido, las primeras investigaciones acerca de la potencialidad de los heteropolicompuestos con estructura del tipo Wells Dawson como catalizadores en la esterificación de ácidos grasos, fueron publicadas por nuestro grupo de investigación en el año 2015. En esa oportunidad, se investigó la actividad catalítica del HPA de Wells-Dawson másico y soportado al 18% sobre  $TiO_2$ , así como también de la sal de cesio con estructura de tipo Wells-Dawson,  $Cs_2H_4P_2W_{18}O_{62}$ , en la esterificación de ácido oleico con metanol. Los autores demostraron que el HPA disperso sobre dióxido de titanio

presentaba la mayor actividad específica ( $6,4 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en la esterificación de ácido oleico con metanol a  $85^\circ\text{C}$  con una relación molar ácido oleico: metanol igual a 1:1 (Matkovic et al., 2015).

Posteriormente, se registró solo un trabajo acerca de la actividad catalítica de un material basado en el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson soportado en una zeolita funcionalizada con imidazol, denominado  $[\text{H}^{6-n}\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{n-}/\text{ZIF}(\text{HnHis.})^{+n}]$  (Narenji-Sani et al., 2020). Este material demostró ser activo en la esterificación de ácidos oleico, láurico, mirístico, esteárico y palmítico con metanol en conversiones entre 78% y 98% en 4 horas de reacción a  $25^\circ\text{C}$ .

#### **1.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA**

La catálisis enzimática es una alternativa eco-compatible para la generación de biocombustibles que ha ganado atención en los últimos años debido a las ventajas que presenta con respecto a la catálisis básica homogénea que se utiliza convencionalmente.

En este sentido, la transesterificación de aceite catalizada con enzimas lipasas consume menos energía que la catálisis básica, ya que la temperatura óptima de estos biocatalizadores es baja. Además, la actividad de las lipasas no está influenciada, por las condiciones en que llega el aceite crudo, como ser el contenido de agua, o la alta concentración de ácidos grasos libres, por lo que los aceites de baja calidad son sustratos adecuados para las mismas. Otra ventaja radica en el hecho que mediante catálisis enzimática no se produce la reacción de saponificación que ocurre comúnmente con el método convencional. Es así que se genera glicerol limpio y se evita el uso de grandes cantidades de agua para la purificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (Biernat et al., 2021).

Las enzimas más adecuadas para biocatalizar la transesterificación de aceite vegetal usado son las lipasas ya que su función en la naturaleza es hidrolizar triglicéridos, asimismo pueden esterificar los ácidos grasos libres proporcionando altos rendimientos a biodiesel (Ullah et al., 2016; Meher et al., 2016; Amini et al., 2017; Moazini, et al., 2019). Estas enzimas pueden obtenerse de fuentes animales, vegetales o microbianas.

### 1.4.1 Actividad catalítica del biocatalizador Eversa® Transform

En 2014, la compañía Novozymes, radicada en Dinamarca y denominada actualmente Novonesis, comenzó a comercializar el primer biocatalizador para la transesterificación de glicéridos y la esterificación de ácidos grasos libres. Esta formulación líquida que contiene lipasas del género *Thermomyces lanuginosus* se denomina Eversa® Transform y Eversa® Transform 2.0. Este biocatalizador es capaz de convertir el aceite de cocina usado y otros aceites de baja calidad en ésteres metílicos de ácidos grasos, denominados comúnmente como biodiesel o FAME por sus siglas en inglés (Monteiro et al., 2021).

Remonatto y colaboradores estudiaron el rendimiento de la formulación líquida comercial Eversa® Transform en la hidrólisis y esterificación de diversos aceites, entre ellos aceites de soja con diferentes porcentajes de ácidos grasos libres, aceite de macauba y aceite de cocina usado, utilizando metanol, agua e hidróxido de sodio (Remonatto et al., 2016). Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 horas a 250 rpm y 35°C obteniendo conversiones hacia FAME que oscilaron entre 80,9 y 97,2%. Ese mismo año, se investigó la transesterificación de aceite de soja refinado utilizando 3% p/p de agua, 0,2% p/p de Eversa® Transform y 1,5 equivalentes de metanol a 35°C y 500 rpm. Luego de 22 horas de reacción se obtuvo un rendimiento superior al 97% (Nielsen et al., 2016). La investigación de Coppini y colaboradores demostró que Eversa® Transform 2.0 es activo en la hidroesterificación de la grasa de pollo, cuya reacción alcanzó una conversión del 94% al utilizar 0,3% p/p del biocatalizador; 1,5% p/p de agua y 1,5% p/p de metanol a 45°C (Coppini et al., 2019).

Más recientemente, se estudió la actividad de Eversa® Transform en la hidrólisis de aceite de soja (Vieira et al., 2021). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 48 horas con agua agregada al medio de reacción, generando un 72,5% p/p de ácidos grasos libres. Además, la esterificación/transesterificación de una fase saponificada del aceite de soja con 8,4% p/p del biocatalizador a 35°C durante 23 horas, con etanol como aceptor de acilo produjo 86,6% p/p de ésteres etílicos de ácidos grasos.

Por otra parte, se han publicado estudios acerca de la performance de los catalizadores Eversa® Transform y Eversa® Transform 2.0 inmovilizados sobre soportes hidrofóbicos en la etanólisis y metanólisis de aceites de girasol en medios anhidros. El derivado más activo fue el biocatalizador Eversa® inmovilizado sobre Sepabeads C-18

(resina adsorbente sintética), que produjo un rendimiento del 99% en el éster etílico en 3 horas de reacción a 40°C, utilizando 10% de biocatalizador y hexano como solvente (Remonatto et al., 2018). Asimismo, otros trabajos indican que la inmovilización de Eversa® sobre soportes hidrofóbicos, como Sepabeads C-18, dióxido de silicio, poliestireno, espuma de poliuretano, octil agarosa, agarosa aminada, matrices de octadecilo metacrilato, etc., estabiliza la conformación abierta de la lipasa mejorando la actividad y estabilidad de la misma (Arana-Peña et al., 2018; Martínez-Sánchez et al., 2020; Monteiro et al., 2021).

#### **1.4.2 Actividad catalítica del látex de *Araujia sericifera***

Si bien las lipasas de origen microbiano son las más utilizadas para aplicaciones industriales, su costo suele ser elevado y, por este motivo, las lipasas vegetales podrían considerarse como una alternativa más económica debido a que su producción es más sencilla (Foglia & Villeneuve, 1997; Tecelañ et al., 2012; Caro et al., 2004; Troncoso et al., 2022; Mounquengui et al., 2013). Estas enzimas suelen estar presentes dentro de órganos y tejidos ricos en lípidos, principalmente en la semilla, y tienen la función de hidrolizarlos generando la energía necesaria para la germinación de las plantas. Sin embargo, el principal impedimento para su implementación a gran escala es el bajo contenido de enzima en las semillas luego de la germinación (Campillo-Alvarado & Tovar-Miranda, 2013). Para evitar este problema, se debe investigar la presencia de lipasas en otros tejidos vegetales y por esta razón la búsqueda de otras fuentes está en curso continuamente (Moussavou et al., 2016; Nanssou Kouteu et al., 2016; Nanssou Kouteu et al., 2017).

En este contexto, se ha estudiado el uso del látex que producen algunas plantas como defensa contra patógenos y herbívoros, cuya composición puede incluir terpenoides, polisacáridos, alcaloides, proteínas y enzimas, como las proteasas y las hidrolasas, las cuales se encuentran en menor proporción (Agrawal & Konno, 2009; Konno, 2011; Seth et al., 2014). En los últimos años, se han investigado las lipasas provenientes de látex vegetal, siendo la *Carica papaya* (CPL) la más estudiada de este tipo de enzimas (Mazou et al., 2016; Pinyaphong et al., 2011; Su & Wei, 2014). Otras especies de plantas pertenecientes a las familias Vascocellea, Moraceae, Euphorbiaceae y Apocynaceae

presentan actividad lipasa y muestran características catalíticas muy similares a CPL (Cambon et al., 2008; Mazou et al., 2017; Caro et al., 2000; Cambon et al., 2006; Di Santo Meztler et al., 2014).

Entre la familia Apocynaceae, se encuentra la enredadera nativa de América del Sur denominada *Araujia sericifera*, cuya fracción insoluble del látex presente en los frutos fue estudiada por Di Santo Meztler y colaboradores en 2014. La lipasa del látex de esta planta, denominada como ASL, fue investigada en la hidrólisis de aceite de algodón y en la esterificación de ácidos grasos libres demostrando actividad en ambas reacciones (Di Santo Meztler et al., 2014). Por otra parte, se investigó la actividad catalítica de la lipasa en la esterificación de ácido oleico con metanol mostrando una temperatura óptima a los 40°C con 0,04% p/p de biocatalizador. La actividad enzimática de esta lipasa se comparó con la del biocatalizador comercial Novozym® 435, el cual está compuesto por la lipasa B de *Candida antarctica* de origen microbiano. La enzima vegetal resultó más activa (60,7 vs 8,0  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) que la lipasa comercial incluso a una temperatura de reacción más baja (40°C vs 85°C) (Matkovic et al., 2016).

Asimismo, la actividad catalítica de la enzima ASL fue estudiada en la esterificación de ácido oleico con diferentes alcoholes, así como también en la transesterificación de aceite de soja refinado. La hidrólisis de aceite fue llevada a cabo con agua agregada y su desempeño se comparó con biocatalizadores comerciales, como Novozym® 435, Lipozyme® RM IM y Lipozyme® TL IM (Sánchez et al., 2019). La enzima vegetal presentó un 42% de rendimiento hacia ácidos grasos libres luego de una hora de reacción y 68% a las 5 horas a 30°C. El estudio de la esterificación de ácidos grasos libres se realizó con ácido oleico y diferentes alcoholes obteniendo una conversión máxima del 91% a las 5 horas usando 1-octanol (Sánchez et al., 2019). Estos estudios, cuyos detalles se presentan en el Capítulo 2 de esta Tesis, han demostrado que la enzima vegetal ASL podría ser un biocatalizador prometedor en la valorización de aceite comestible usado.

## **1.5 OBJETIVOS DE LA TESIS**

El presente trabajo tiene como objetivo general el estudio de las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación catalíticas de aceite comestible usado a fin de obtener ésteres de ácidos grasos.

La hipótesis de trabajo se fundamenta en la potencialidad de biocatalizadores enzimáticos y sólidos con propiedades ácidas para catalizar la hidrólisis, esterificación y transesterificación de triglicéridos con alcoholes.

Los objetivos específicos son:

- Sintetizar y caracterizar materiales fosfotúngsticos con estructura Wells-Dawson másicos y soportados.
- Evaluar la actividad catalítica de los materiales fosfotúngsticos a través de la esterificación de ácido oleico con metanol como reacción test.
- Analizar matemáticamente los datos de actividad catalítica a través de superficies de respuesta para establecer las condiciones óptimas de reacción.
- Investigar la actividad catalítica de los materiales fosfotúngsticos más promisorios en la transesterificación de aceite de girasol usado en las condiciones óptimas halladas.
- Investigar la actividad biocatalítica de la lipasa vegetal de *Araujia Sericifera* ASL en la hidrólisis de aceite de girasol usado en cocción.
- Investigar la actividad biocatalítica de la lipasa vegetal de *Araujia Sericifera* ASL en la esterificación de ácidos grasos y transesterificación de aceite de girasol usado en cocción con distintos alcoholes de cadena corta.
- Optimizar las condiciones de operación del biocatalizador comercial Eversa® Transform en la transesterificación de aceite de girasol usado en cocción con alcoholes de cadena corta.
- Estudiar la combinación de la lipasa vegetal ASL, y fúngica Eversa® Transform, en la hidrólisis, esterificación y transesterificación de aceite usado en cocción.

## **1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agrawal, A. A. & Konno, K. (2009). Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 311–331.

- Agrofy. (12 de octubre de 2016). Recuperado en mayo de 2024 de <https://news.agrofy.com.ar/noticia/161392/aceite-girasol-que-es-mas-elegido>
- Agrositio (6 de abril de 2022). Recuperado en mayo de 2024 de <https://www.agrositio.com.ar/noticia/222245-se-desechan-hasta-90-millones-de-litros-de-aceite-vegetal-usado-por-ano.html>.
- Alsalmé, A.; Kozhevnikova, E. F.; Kozhevnikov, I. V. (2008). Heteropoly acids as catalysts for liquid-phase esterification and transesterification. *Appl. Catal. A Gen.* 349, 170–176.
- Amini, Z.; Ilham, Z.; Ong, H. C.; Mazaheri, H.; Chen, W. H. (2017). State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Convers. Manag.* 141, 339-353.
- Anastas, P.T. & Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: theory and practice*, Ed. S. Publications, Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Arana-Peña, S.; Lokha, Y.; Fernandez-Lafuente, R. (2018). Immobilization of Eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. *Catalysts* 8, 1–15.
- Arismendi Londoño, J. P.; Avendaño Avendaño, A. J.; Parra Llanos, J. W.; Rodríguez Ordoñez, D. C. (1-3 de diciembre de 2021). Aprovechamiento de aceites vegetales usados para la obtención de biodiésel de segunda generación: una revisión. XI Congreso Brasileño de Ingeniería de Producción.
- Avila, A. J. (2020). *Síntesis de triglicéridos estructurados por catálisis heterogénea* [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina].
- Banerjee, A.; Chakraborty, R. (2009). Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production—A review. *Resour. Conserv. Recy.* 53, 490-497.
- Bertini, E. A. (2021). *Aceitando Buenos hábitos* [Trabajo final de grado, Universidad Siglo 21, Córdoba, Argentina].

- Biernat, K.; Matuszewska, A.; Samson-Bręk, I.; Owczuk, M. (2021). Biological methods in biodiesel production and their environmental impact. *Appl Sci.* 11, 10946.
- Bohigues Vallet, B. (2021). Materiales de tipo metal-orgánico basados en metales tetravalentes y su aplicación en catálisis heterogénea [Trabajo de fin de Máster en Química Sostenible, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Tecnología Química, Valencia, España].
- Briand, L. E.; Baronetti, G. T.; Thomas, H. J. (2003). The state of the art on Wells-Dawson heteropoly-compounds: A review of their properties and applications. *Appl. Catal. A Gen.* 256, 37–50.
- Buenos Aires Ciudad, s.f. *Aceite Vegetal Usado*. Recuperado en mayo de 2024 de <https://buenosaires.gob.ar/residuos/aceite-vegetal-usado>
- Cambon, E.; Gouzou, F.; Pina, M.; Baréa, B.; Barouh, N.; Lago, R.; Ruales, J.; Tsai, S. W.; Villeneuve, P. (2006). Comparison of the Lipase Activity in Hydrolysis and Acyl Transfer Reactions of Two Latex Plant Extracts from Babaco (*Vasconcellea × Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the Aqueous Microenvironment. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7, 2726-2731.
- Cambon, E.; Rodriguez, J. A.; Pina, M.; Arondel, V.; Carriere, F.; Turon, F.; Ruales, J.; Villeneuve, P. (2008). Characterization of typo-, regio-, and stereo-selectivities of babaco latex lipase in aqueous and organic media. *Biotechnol. Lett.* 30, 769–774.
- Campillo-Alvarado, G.; Tovar-Miranda, R. (2013). Recent advances and applications of the lipolytic activity of *Carica papaya* latex. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 90, 49- 60.
- Cao, F.; Chen, Y.; Zhai, F.; Li, J.; Wang, J.; Wang, X.; Wang, S.; Zhu, W. (2008). Biodiesel production from high acid value waste frying oil catalyzed by superacid heteropolyacid. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 93-100.
- Caro, Y.; Villeneuve, P.; Pina, M.; Reynes, M.; Graille, J. (2000). Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. *JAOCS* 77, 349–354.

- Caro, Y.; Turon, F.; Villeneuve, P.; Pina, M.; Graille, J. (2004). Enzymatic synthesis of medium-chain triacylglycerols by alcoholysis and interesterification of copra oil using a crude papain lipase preparation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 503–512.
- Coppini, M.; Magro, J. C.; Martello, R.; Valério, A.; Zenevich, M. C.; de Oliveira, D.; Oliveira, J. V. (2019). Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue. *Braz. J. Chem. Eng.* 36, 923–8.
- Da Costa Pimienta, C. C. (2022). La Economía Circular como eje de desarrollo de los países latinoamericanos. *Economía y política*, 35.
- Demeco, L.; O'Farrell, J.; Freytes, C.; Aneise, A.; Arias Mahiques, V. (2021). La discusión de los biocombustibles en la Argentina. Buenos Aires, Fundar.
- Di Santo Meztler, P.; Fait, M. E.; Foresti, M.L.; Morcelle, S. R. (2014). Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex. *Catal. Sci. Technol.* 4, 1386–1394.
- ElDiarioAr. (29 de diciembre de 2023). Recuperado en mayo de 2024 de [https://www.eldiarioar.com/sociedad/medio-ambiente/no-caneria-beneficios-ambientales-economicos-reciclar-aceite-usado\\_1\\_10796051.html](https://www.eldiarioar.com/sociedad/medio-ambiente/no-caneria-beneficios-ambientales-economicos-reciclar-aceite-usado_1_10796051.html)
- Esmi, F.; Borugadda, V. B.; Dalai, A. K. (2022). Heteropoly acids as supported solid acid catalysts for sustainable biodiesel production using vegetable oils: A review. *Catal.* 404, 19–34.
- Fan, X.; Niehus, X.; Sandoval, G. (2012). Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Methods Mol. Biol.* 861, 471-483.
- Foglia, T. A. & Villeneuve, P. (1997). Carica papaya latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1447–1450.
- García-López, E. I.; Marcì, G.; Krivtsov, I.; Casado Espina, J.; Liotta, L. F.; Serrano, A. (2019). Local structure of supported Keggin and Wells-Dawson heteropolyacids and its influence in the catalytic activity. *J. Phys. Chem. C* 123, 19513–19527.

- Gaurav, A.; Dumas, S.; Mai, C. T. Q.; Ng, F. T. T. (2019). A kinetic model for a single step biodiesel production from a high free fatty acid (FFA) biodiesel feedstock over a solid heteropolyacid catalyst. *GEE* 4,3, 328-341.
- González Canal, I.; González Ubierna, J. A. (2015). *Aceites usados de cocina. Problemática ambiental, incidencias en redes de saneamiento y coste del tratamiento en depuradoras*.  
<https://www.residusmunicipals.cat/uploads/activitats/docs/20170427092548.pdf>
- Gupta, J.; Agarwal, M.; Dalai, A. K. (2020). An overview on the recent advancements of sustainable heterogeneous catalysts and prominent continuous reactor for biodiesel production. *J. Ind. Eng. Chem.* 88, 58-77.
- Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochem.* 72, 1510–1530.
- Mannu, A.; Garroni, S.; Ibanez Porras, J.; Mele, A. (2020). Available Technologies and Materials for Waste Cooking Oil Recycling. *Processes* 8, 366.
- Martínez-Sánchez, J. A.; Arana-Peña, S.; Carballares, D.; Yates, M.; Otero, C.; Fernández-Lafuente, R. (2020). Immobilized biocatalysts of Eversa® transform 2.0 and lipase from *Thermomyces lanuginosus*: comparison of some properties and performance in biodiesel production. *Catalysts* 10, 738.
- Matkovic, S. R.; Collins, S. E.; Bonivardi, A. L.; Bañares, M. A.; Briand, L. E. (2015). Molecular structure and thermal stability of the oxide-supported phosphotungstic Wells–Dawson heteropolyacid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 8097–8105.
- Matkovic, S. R.; Nilsson, J. F.; Fait, M. E.; Morcelle, S. R.; Briand, L. E. (2016). Screening of novel materials for biodiesel production through the esterification of oleic acid. *Catal. Lett.* 146, 2341- 2347.
- Mazou, M.; Djossou, A. J.; Tchobo, F. P.; Villeneuve, P.; Soumanou, M. M. (2016). Plant latex lipase as biocatalysts for biodiesel production. *Afr. J. Biotechnol.* 15, 1487-1502.

- Mazou, M.; Djossou, A. J.; Tchobo, F. P.; Villeneuve, P.; Soumanou, M. M. (2017). Catalytic properties of lipase from *Ficus trichopoda* and *Euphorbia unispina* latex: Study of their typoselectivity. *J. Appl. Biosci.* 110, 10790-10801.
- Meher, L.; Vidyasagar, D.; Naik, S. (2016). Technical aspects of biodiesel production by transesterification. *Renew. and Sust. Ener. Reviews* 10, 42, 248-68.
- Mibielli, G. M.; Fagundes, A. P.; Bender, J. P.; Oliveira, J. V. (2019). Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low cost feedstocks. *Bioresour. Technol. Rep.* 5, 150–156.
- Misono, M. (2001). Unique acid catalysis of heteropoly compounds (heteropolyoxometalates) in the solid state. *Chem Commun.* 1141-1152.
- Mizuno, N. & Misono, M. (1998). Heterogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* 98, 199-218.
- Moazeni, F.; Chen, Y. C.; Zhang, G.; Clean, J. (2019). Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. *Prod.* 216, 117-128.
- Monteiro, R. R. C.; Arana-Peña, S.; da Rocha, T. N.; Miranda, L. P.; Berenguer-Murcia, A.; Tardioli, P. W.; dos Santos, J. C. S.; Fernandez-Lafuente, R. (2021). Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renew. Energ.* 164, 1566–87.
- Mounguengui, R. W. M.; Brunschwig, C.; Baréa, B.; Villeneuve, P.; Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Prog. Energ. Combust.* 39, 441-456.
- Moussavou, R. W.; Brunschwig, C.; Baréa, B.; Villeneuve, P.; Blin, J. (2016). Assessing the enzyme activity of different plant extracts of biomasses from Sub-Saharan Africa for ethyl biodiesel production. *Energ. Fuel* 30, 2356-2364.
- Moya-Salazar, M. M. & Moya-Salazar, J. (2020). Biodegradación de residuos de aceite usado de cocina por hongos lipolíticos: un estudio in vitro. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 36 (2) 351-359.

- Nanssou Kouteu, P. A.; Baréa, B.; Barouh, N.; Blin, J.; Villeneuve, P. (2016). Lipase Activity of Tropical Oilseed Plants for Ethyl Biodiesel Synthesis and Their Typo- and Regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.* 64, 8838–8847.
- Nanssou Kouteu PA, Blin J, Baréa B, Barouh N, Villeneuve P. (2017). Solvent-Free Biodiesel Production Catalyzed by Crude Lipase Powder from Seeds: Effects of Alcohol Polarity, Glycerol, and Thermodynamic Water Activity. *J. Agric. Food Chem.* 65, 8683–8690.
- Narenji-Sani, F.; Tayebee, R.; Chahkandi, M. (2020). New Task-Specific and Reusable ZIF-like Grafted  $H_6P_2W_{18}O_{62}$  Catalyst for the Effective Esterification of Free Fatty Acids. *ACS Omega* 5, 9999–10010.
- Narkhede, N.; Patel, A. (2013). Biodiesel production by esterification of oleic acid and transesterification of soybean oil using a new solid acid catalyst comprising 12-tungstosilicic acid and zeolite H $\beta$ . *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 13637–13644
- Nielsen, P. M.; Rancke-Madsen, A.; Holm, H. C.; Burton, R. (2016). Production of biodiesel using liquid lipase formulations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 905–10.
- Nikas, A.; Koasidis, K.; Koberle, A. C.; Kourtesi, G.; Doukas, H. (2022). A comparative study of biodiesel in Brazil and Argentina: An integrated systems of innovation perspective. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 156, 112022.
- National Geographic (17 de abril de 2024). *Qué hacer con el aceite de cocina usado: ¿Se puede reciclar?* Recuperado en abril de 2024 de <https://www.nationalgeographicla.com/medio-ambiente/2024/04/que-hacer-con-el-aceite-de-cocina-usado-se-puede-reciclar>
- OCDE iLibrary (2023). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas*. Recuperado en mayo de 2024 de <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/17ea948b-es/index.html?itemId=/content/component/17ea948b-es>
- Orege, J. I.; Oderinde, O.; Kifle, G. A.; Ibikunle, A. A.; Raheem, S. A.; Ejeromedoghene, O.; Okeke, E. S.; Olukowi, O. M.; Orege, O. B.; Fagbohun, E. O.; Ogundipe, T. O.; Avor,

- E. P.; Ajayi, O. O.; Daramola, M. O. (2022). Recent advances in heterogeneous catalysis for green biodiesel production by transesterification. *Energy Conv. Manag.* 258, 115406.
- Palermo, V. (2012). Síntesis y caracterización de heteropoliácidos constituyendo materiales híbridos para su aplicación como catalizadores en la oxidación ecocompatible de sulfuros [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina].
- Pampa Gringa (22 de marzo de 2024). *Los actores del mercado del biocombustible en Argentina*. Recuperado en abril de 2024 de <https://pampagringa.com.ar/contenido/3648/los-actores-del-mercado-del-biocombustible-en-argentina>
- Park, D. R.; Park, S.; Bang, Y.; Song, I. K. (2008). Redox properties of  $H_3PMo_xW_{12-x}O_{40}$  and  $H_6P_2Mo_xW_{18-x}O_{62}$  heteropolyacid catalysts and their catalytic activity for benzyl alcohol oxidation. *Appl. Catal. A Gen.* 349 (1–2), 222–228.
- Park, D. R.; Song, J. H.; Lee, S. H.; Song, S. H.; Kim, H.; Jung, J. C.; Song, I. K. (2010). Redox properties and oxidation catalysis of group 5 metal (V, Nb, Ta)-containing Keggin and Wells–Dawson heteropolyacid (HPA) catalysts. *Appl. Catal. A Gen.* 373, 201-207.
- Pasquale, G.; Vázquez, P; Romanelli, G.; Baronetti, G. (2012). Catalytic upgrading of levulinic acid to ethyl levulinate using reusable silica-included Wells-Dawson heteropolyacid as catalyst. *Catal. Commun.* 18, 115-120.
- Pierri, J. & Julianello, F. (2019). Evolución de la producción del biodiesel en Argentina: volumen, precio, políticas públicas y empresas. Documentos del PROINGRA. Programa de Investigación de la Producción y Comercio de Granos.
- Pinyaphong, P.M; Sriburi, P.; Phutrakul, S. (2011). Biodiesel fuel production by methanolysis of fishoil derived from the discarded parts of fish catalyzed by Carica papaya lipase. *WASET* 76, 466-472.
- RBA Ambiental (s.f.). *¿Qué es el aceite de cocina usado?* Recuperado en mayo de 2024

de <http://www.rba-ambiental.com.ar/aceite-de-cocina-usado/que-es-el-aceite-de-cocina-usado/>

- Remonato, D.; Santin, C. M. T.; de Oliveira, D.; Di Luccio, M.; de Oliveira, J. V. (2016). FAME production from waste oils through commercial soluble lipase Eversa® catalysis. *Ind. Biotech.* 12, 254–62.
- Remonato, D.; de Oliveira, J. V.; Guisan, J. M.; de Oliveira, D.; Ninow, J.; Fernandez-Lorente, G. (2018). Production of FAME and FAEE via alcoholysis of sunflower oil by Eversa lipases immobilized on hydrophobic supports. *Appl. Biochem. Biotech.* 185, 705–16.
- Ruiz, D. M.; Pasquale, G. A.; Martínez, J. J.; Romanelli, G. P. (2022). Advances in novel activation methods to perform green organic synthesis using recyclable heteropolyacid catalysis. *Green Process. Synth.* 11, 766–809.
- Sambeth, J.; Baronetti, G.; Thomas, H. J. (2003). A theoretical–experimental study of Wells–Dawson acid: An explanation of their catalytic activity. *Mol. Catal. A: Chem.* 191, 35–43.
- Sánchez, D. A.; Morcelle, S. R.; Fait, M. E.; Tonetto, G. M.; Ferreira, M. L. (2019). Application of a Multienzymatic System from Natural Latex in Key Reactions for oil-Based Biorefineries. *Fermentation* 5, 1, 18.
- Sani, Y. M.; Daud, W. M. A. W.; Aziz, A. A. (2014). Activity of solid acid catalysts for biodiesel production: A critical review. *Appl. Catal. A Gen.* 470, 140–161.
- Santori, G.; Di Nicola, G.; Moglie, M.; Polonara, F. (2012). A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. *Appl. Energy* 92, 109–132.
- Seth, S.; Chakravorty, D.; Dubey, V. K.; Patra, S. (2014). An insight into plant lipase research - challenges encountered. *Protein Expres. Purif.* 95, 13–21.
- Sepúlveda, J. H.; Vera, C. R.; Yori, J. C.; Badano, J. M.; Santarosa, D.; Mandelli, D. (2011). H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (HPA), an efficient and reusable catalyst for biodiesel production related

reactions: Esterification of oleic acid and etherification of glycerol. *Quím. Nova* 34, 601–606

Sanz Tejedor, A. (s.f.) *Química Orgánica Industrial*. Recuperado en mayo de 2024 de <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-02.php>

Sigauo, D. & Terre, E. (2018). *El mercado mundial de aceites vegetales: situación actual y perspectivas*. Recuperado en mayo de 2024 de <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/el-mercado-10>

Su, F. & Guo, Y. (2014). Advancements in solid acid catalysts for biodiesel production. *Green Chem.* 16, 2934-2957.

Su, E. & Wei, D. (2014). Production of fatty acid butyl esters using the low cost naturally immobilized Carica papaya lipase. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6375–6381.

Tecelaõ, C.; Rivera, I.; Sandoval, G.; Ferreira-Dias, S. (2012). Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 266–276.

Torres Rivero, L. A.; Ben-Youseff, C.; Alcocer-T, B.; De La Rosa-G, D. (2017). Efecto de la temperatura y del tiempo de reacción sobre la esterificación y la transesterificación de aceites comestibles usados. *Revista de Cs Naturales y Agropecuarias* 4, 13, 19-35.

Troncoso, F. D.; Sánchez, D. A.; Ferreira, M. L. (2022). Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *Chemistry Open* 11, 3.

Tropecêlo, A. I.; Casimiro, M. H.; Fonseca, I. M.; Ramos, A. M.; Vital, J.; Castanheiro, J. E. (2010). Esterification of free fatty acids to biodiesel over heteropolyacids immobilized on mesoporous silica. *Appl. Catal. A Gen.* 390, 183–189.

Ullah, F.; Dong, L.; Bano, A.; Peng, Q.; Huang, J. (2016). Current advances in catalysis toward sustainable biodiesel production. *J. Energy Inst.* 89, 282-292.

Universidad Nacional de La Plata (20 de marzo de 2024). *Aceite vegetal usado*.

Recuperado en abril de 2024 de <https://unlp.edu.ar/institucional/ambiente/verde/aceite-vegetal-usado-avu-79179/>

Vieira, A. C.; Moulin Cansian, A. B.; Guimaraes, J. R.; Marquettotti Salcedo Vieira, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Tardioli, P. W. (2021). Performance of liquid Eversa on fatty acids ethyl esters production by simultaneous esterification/transesterification of low-to-high acidity feedstocks. *Catalysts* 11, 1486.

Yu, X.; Guo, Y.; Li, K.; Yang, X.; Xu, L.; Guo, Y.; Hu, J. (2008). Catalytic synthesis of diphenolic acid from levulinic acid over cesium partly substituted Wells–Dawson type heteropolyacid. *J. Mol. Catal. A Chem.* 290, 44-53.

Zapien-Gómez, J.; Vásquez-Reyez, E.; Pozuelo-Rivera, M.; Zorrilla-Romo, A. M.; Flores-Bastida, E. A.; Guzmán-García, O. D.; Gutiérrez-Arredondo, J. E.; Vázquez-Núñez, E. (2023). Principios de química verde aplicados a la síntesis de materiales carbonosos para su uso en remediación ambiental. *Jóvenes en la ciencia*, 21, 1–8. Recuperado en mayo de 2024 de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4125>

<sup>a</sup>Zhang, Q.; Lei, D.; Luo, Q.; Wang, J.; Deng, T.; Zhang, Y.; Ma, P. (2020). Efficient biodiesel production from oleic acid using metal–organic framework encapsulated Zr-doped polyoxometalate nano-hybrids. *RSC Adv.* 10, 8766-8772.

<sup>b</sup>Zhang, Q.; Liu, X.; Deng, T.; Zhang, Y.; Ma, P. (2020). Recent Progress on Heteropolyacids for Green Fuels Synthesis. *Curr. Green Chem.* 7, 267-281.

# **CAPÍTULO 2**

## **ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS CATALÍTICOS ENZIMÁTICOS**

En este capítulo se presenta una reseña bibliográfica acerca de los usos, preparación y caracterización de la lipasa vegetal *Araujia sericifera* ASL y el biocatalizador comercial Eversa® Transform, que fueron utilizados en las investigaciones presentadas en esta Tesis.

## **2.1. LIPASA VEGETAL *Araujia sericifera* ASL**

### **2.1.1. Antecedentes**

Recientemente se han reportado estudios preliminares acerca de la actividad biocatalítica de la lipasa extraída del fruto de la especie vegetal autóctona conocida como *Araujia sericifera*. En este sentido, se demostró la actividad catalítica de esta lipasa (denominada ASL) en la esterificación de ácido oleico con metanol. En este caso, se trabajó con un sistema heterogéneo donde ambos reactivos se encuentran en fase líquida y la lipasa está auto-soportada en el látex vegetal como se detallará más adelante en este capítulo. Investigaciones previas determinaron que la temperatura óptima de la lipasa es de 40°C y que la cantidad de enzima utilizada en el medio de reacción posee un rol importante en su actividad (Matkovic, 2016). En este sentido, los autores demostraron que 10,7 mg de lipasa cada 20,0 g de ácido oleico (0,05%) resultaba óptimo en términos de conversión a oleato de metilo. Una mayor proporción de biocatalizador conducía a la agregación de la enzima y la disminución de la cantidad de sitios activos expuestos para la interacción con el sustrato.

Asimismo, se han reportado estudios acerca de la actividad catalítica de ASL en la esterificación de ácido oleico con distintos alcoholes como: 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-octanol; con el agregado de n-heptano como co-solvente al medio de reacción, a 30°C y 600 rpm durante 5 horas (Sánchez, 2019). Nuevamente, estas investigaciones permitieron concluir que la cantidad de lipasa tiene influencia directa en la actividad catalítica y que, en este caso, fue de un 10% respecto a la masa de ácido oleico.

Con relación a la influencia de la naturaleza del alcohol en la actividad biocatalítica, los autores observaron que las conversiones más altas (90%) se obtuvieron con 1-octanol a 30°C.

Adicionalmente, en este trabajo se presentaron los estudios de la actividad de la ASL en la hidrólisis del aceite de soja. En este caso, se investigó la influencia del agua agregada al medio de reacción con lo cual, evidenciaron que el mayor rendimiento a ácidos grasos libres (68%) se obtenía con relaciones molares aceite: agua de 1:9 y 1:12.

Los autores también demostraron que la lipasa ASL es activa en la esterificación de aceite de soja con 1-octanol a 30°C y con un porcentaje similar de lipasa que el mencionado anteriormente.

### 2.1.2 Preparación del látex de *Araujia sericifera*

La *Araujia sericifera* (Apocynaceae, subfamilia Asclepiadaceae) es una enredadera nativa de América del Sur. La misma se caracteriza por poseer hojas ovado triangular cuya longitud varía entre 4 y 9 cm y flores de color blanco o rosado las cuales tienen una longitud de unos 15 mm aproximadamente (Figura 2.1). Los frutos, con una longitud promedio de 14 cm, son de color verde azulado y se tornan marrones a medida que maduran, abriéndose finalmente para liberar las semillas (Figura 2.2).

A)



B)



**Figura 2.1.** A) Enredadera de *Araujia sericifera*, B) flores, hojas y fruto.



**Figura 2.2.** Maduración del fruto de *Araujia sericifera*.

La extracción de la lipasa de *Araujia sericifera* (ASL), al igual que su caracterización, fue llevada a cabo por un grupo de investigación perteneciente al Centro de Investigación de Proteínas Vegetales CIPROVE (Facultad de Ciencias Exactas U.N.L.P.) con el cual, se mantiene colaboración científica.

A los fines de la extracción de la lipasa, se cosechan habitualmente alrededor de 5 kg de frutos inmaduros a finales de verano de plantas cultivadas en La Plata, Buenos Aires, Argentina. Luego, el látex se obtiene a partir de los pecíolos del fruto y se recolecta en una solución de 5 mM de EDTA contenida en un baño de hielo como puede observarse en la Figura 2.3. La mezcla se centrifuga a  $9600 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min, para separar la fracción insoluble (gomas) de la fracción soluble. La fracción insoluble, la cual contiene lipasas, se liofiliza y posteriormente, se muele y almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las partículas de biocatalizador poseen formas variables con un diámetro medio de  $44 \pm 24 \mu\text{m}$  (Di Santo Meztler et.al., 2014).



**Figura 2.3.** Látex de *Araujia sericifera*

### 2.1.3 Caracterización del látex de *Araujia sericifera*

En esta sección se presentan las investigaciones, reportadas en la literatura, tendientes a determinar las propiedades catalíticas de la fracción insoluble del látex de *Araujia sericifera*. Esta fracción, que contiene enzimas del tipo lipasas, se denomina ASL que es el acrónimo de *Araujia sericifera lipase*.

#### 2.1.3.1 Determinación de la actividad hidrolítica

Es bien conocido que las lipasas son enzimas hidrolíticas, porque son capaces de catalizar la hidrólisis del enlace éster presente en los aceites y grasas. En particular, las lipasas catalizan la conversión de los triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Asimismo, otras son capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas (García Leandro, 2012).

En este contexto, Di Santo Metzler y col. investigaron la actividad hidrolítica de la ASL mediante la hidrólisis de aceite de semilla de algodón mediante una metodología que involucra el ajuste de pH del aceite con una solución buffer y el agregado de  $\text{CaCl}_2$  e isooctano para generar dos fases (Di Santo Metzler, 2014). A este sistema bifásico se le agrega la enzima ASL, que se deja reaccionar a  $40^\circ\text{C}$  durante 2 min.

Se extrae una alícuota de la fase orgánica y se determina la actividad hidrolítica mediante el uso de una versión adaptada del método de Kwon y Rhee, el cual se basa en la formación de  $\text{Cu}^{+2}$  a partir de la reacción entre  $\text{CuAc}_2$  y los ácidos grasos liberados debido a la acción de las lipasas (Kwon, 1986). A la fase orgánica extraída (fase superior) se le añade una solución 5% p/v de  $\text{CuAc}_2$  previamente llevada a pH 6,1 con piridina. La mezcla obtenida se mezcla vigorosamente en un agitador vortex y se mide la absorbancia a 715 nm del complejo resultante. La determinación de la actividad biocatalítica, en términos de micromoles de ácido oleico producidos por minuto ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ), se realiza con una curva de calibración con ese ácido graso.

Los autores también estudiaron el efecto del pH y de la temperatura de reacción en la actividad hidrolítica de la ASL. En este contexto, el efecto del pH fue estudiado usando varias soluciones de sales de sodio de la serie conocida como buffers Good. Los valores de pH a los cuales se ensayó la actividad de la ASL a  $40^\circ\text{C}$  fueron 4; 6; 7; 8; 8,5; 10; 12 y

13,4. Por otro lado, el efecto de la temperatura fue evaluado entre 17 y 80°C usando el buffer Tris-HCl de pH 8,5.

Los resultados de este método mostraron que para los diferentes buffers Good ensayados, el pH óptimo está entre 8,0 y 9,0. Luego se llevó a cabo la hidrólisis con el buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 y la actividad encontrada fue un 87% más alta que utilizando el buffer Good al mismo pH. La conversión de aceite de algodón a ácido oleico usando el buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 fue de 27% (Di Santo Metzler, 2014).

### **2.1.3.2 Determinación de la actividad catalítica de ASL en la síntesis de ésteres de ácidos grasos**

Di Santo Metzler y col. también investigaron la actividad catalítica de la enzima ASL en la esterificación de ácidos grasos libres. En particular, ensayaron la esterificación de ácido butírico, ácido caproico y ácido laúrico con n-butanol (Di Santo Metzler, 2014). Los autores adaptaron una metodología publicada previamente por Vacek y col. para la esterificación enzimática de ácidos grasos (Vacek, 2000). Las reacciones se llevaron a cabo a 40°C, 300 rpm durante 1 hora con distintos disolventes orgánicos (n-hexano y n-heptano) y luego de transcurrida la hora de ensayo se detuvo mediante la adición de etanol absoluto.

Estas reacciones se realizaron a distintas temperaturas, entre 25 y 50°C en las reacciones con n-hexano, donde se obtuvo una temperatura óptima a 40°C, y entre 25 y 70°C cuando se usó n-heptano, con un rango óptimo entre 50 y 60°C. En ambos solventes se observó una mayor actividad con ácido butírico y laúrico y fue más alta con n-heptano que con n-hexano.

Adicionalmente, las reacciones se llevaron a cabo con diferentes cantidades de catalizador, entre 2,5 y 20 mg y se obtuvo una mayor actividad usando 10 mg de ASL cada 10 mL de la mezcla del solvente con los sustratos (20 mM de alcohol y 40 mM de ácidos grasos) (Di Santo Metzler, 2014).

Las investigaciones antes detalladas permiten concluir que la lipasa vegetal ASL actúa como biocatalizador en la hidrólisis de triglicéridos y esterificación de ácidos grasos libres.

## **2.2. BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM**

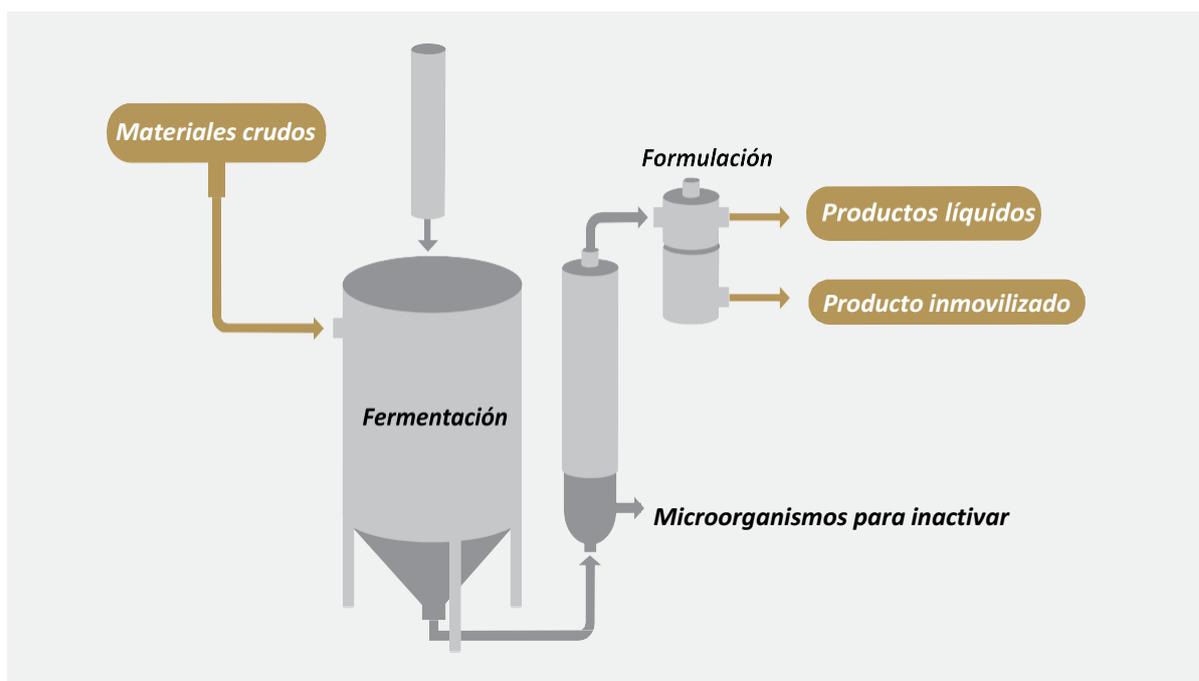
### **2.2.1. Antecedentes**

En los últimos años se han presentado estudios sobre la actividad de este biocatalizador con distintos tipos de aceite. En 2016 Remonatto y colaboradores estudiaron la performance de la enzima en la hidrólisis y esterificación de aceite de soja con diferentes porcentajes de ácidos grasos libres, aceite de macauba y de cocina usado. Estas reacciones se llevaron a cabo con metanol, agua e hidróxido de sodio a 35°C y 250 rpm durante 16 horas y obtuvieron conversiones entre 80,9 y 97,2% (Remonatto, 2016). En ese mismo año, Nielssen investigó la actividad de este biocatalizador en la transesterificación de aceite de soja refinado usando 3% en peso de agua, 0,2% en peso de Eversa® Transform y una relación molar aceite: metanol 1:1,5 obteniendo un rendimiento del 97% a 35°C y 500 rpm luego de 22 horas de reacción (Nielssen, 2016).

Recientemente, fue estudiada la hidrólisis de aceite de soja destilado. La reacción se realizó con agua agregada, se llevó a cabo durante 48 horas a 37°C dando un rendimiento a ácidos grasos libres de 72,5% en peso. Adicionalmente, en el mismo trabajo se presentaron los resultados de la esterificación/transesterificación de una fase saponificada de aceite de soja, la cual se hizo reaccionar con etanol en presencia de 8,4% de biocatalizador a 35°C y 23 horas. El rendimiento obtenido a ésteres etílicos de ácidos grasos fue de 86,6% en peso (Vieira, 2021).

### **2.2.2. Preparación y caracterización del biocatalizador**

En la mayoría de los casos, la producción de enzimas industriales se lleva a cabo a partir de la identificación de un gen que codifica una enzima específica, que luego se inserta en el genoma de un microorganismo bien conocido. Este microorganismo se alimenta con azúcar y otros nutrientes y se cultiva en procesos de fermentación. En la formulación se pueden usar aditivos para asegurar la estabilidad y la vida útil del producto enzimático (The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook, s.f.).



**Figura 2.4.** Ejemplo de producción industrial de enzimas

El biocatalizador comercial Eversa® Transform está compuesto por la lipasa fúngica *Thermomyces lanuginosus*, la cual se encuentra en una solución acuosa, y fue provisto por Rachel Burton perteneciente a la empresa Novozym radicada en Estados Unidos de Norteamérica (Durham, Carolina del Norte).

En este producto, la actividad enzimática clave la proporciona la lipasa que hidroliza los enlaces de éster en los glicéridos. La actividad declarada por la empresa Novozymes es 100 KLU/g, donde 1kLU=1000 LU y 1LU es la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico titulable por minuto a pH=7 y 35°C.

### 2.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Di Santo Meztler, P.; Fait, M. E.; Foresti, M. L.; Morcelle, S. R. (2014). Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex. *Catal. Sci. Technol.* 4, 1386-1394.

- Fait, M. E. (2017). Caracterización fisicoquímica y biológica de tensioactivos derivados de aminoácidos obtenidos por biocatálisis enzimática [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina].
- García Leandro, M. V. (2012). Caracterización de la actividad de las enzimas hidrolíticas localizadas en la región cecal de cuyes (*cavia porcellus*). [Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú].
- Known, D. Y.; Rhee, J. S. (1986). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 89.
- Matkovic, S. R.; Nilsson, J. F.; Fait, M. E.; Morcelle, S. R.; Briand, L. E. (2016). Screening of Novel Materials for Biodiesel Production Through the Esterification of Oleic Acid. *Catal. Lett.* 146, 2341-2347.
- Morcelle, S. R.; Liggieri, C. S.; Bruno, M. A.; Priolo, N.; Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 177–182.
- Nielsen, P. M.; Rancke-Madsen, A.; Holm, H. C.; Burton, R. (2016). Production of biodiesel using liquid lipase formulations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 905-910.
- Obregón, W. D.; Arribére, M. C.; Morcelle Del Valle, S.; Liggieri, C.; Caffini, N.; Priolo, N. (2001). Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* 20, 317–325.
- Ota, S.; Moore, S.; Stein, W. H. (1964). Preparation and Chemical Properties of Purified Stemand Fruit Bromelains. *Biochemistry* 3, 180–185.
- Priolo, N.; Morcelle Del Valle, S.; Arribére, M. C.; López, L.; Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem* 19, 39–49.
- Remonato, D.; Santin, C. M. T.; de Oliveira, D.; Di Luccio, M.; de Oliveira, J. V. (2016). FAME production from waste oils through commercial soluble lipase Eversa® catalysis. *Ind. Biotech.* 12, 254-262.

Sánchez, D. A.; Morcelle, S. R.; Fait, M. E.; Tonetto, G. M.; Ferreira, M. L. (2019). Application of a Multienzymatic System from Natural Latex in Key Reactions for oil-Based Biorefineries. *Fermentation* 5, 18.

The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook, s.f. [citado el 15 de junio del 2020]. Disponible en: <https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/food-and-beverage/vegetable-oils-processing/biodiesel>

Vacek, M.; Zarevúcka, M.; Wimmer, Z.; Stránský, K.; Demnerova, K.; Legoy, M. D. (2000). Selective enzymic esterification of free fatty acids with n-butanol under microwave irradiation and under classical heating. *Biotechnol. Lett.* 22, 1565-1570.

Vieira, A. C.; Moulin Cansian, A. B.; Guimarães, J. R.; Marquettotti Salcedo Vieira, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Tardioli, P. W. (2021). Performance of liquid Eversa on fatty acids ethyl esters production by simultaneous esterification/transesterification of low-to-high acidity feedstocks. *Catalysts* 11, 1486.

# CAPÍTULO 3

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS FOSFOTÚNGSTICOS CON ESTRUCTURA WELLS-DAWSON

En este capítulo se describe la metodología utilizada para la síntesis y caracterización de heteropolicompuestos con estructura Wells-Dawson, así como también la dispersión del heteropoliácido sobre un soporte oxidico.

### 3.1 SÍNTESIS Y DISPERSIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS

#### FOSFOTÚNGTICOS DE ESTRUCTURA WELLS-DAWSON

##### 3.1.1 Síntesis del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson y las heteropolisales másicas

La síntesis del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson se realizó a partir de la sal de amonio de estructura homónima. La preparación de esta sal fue llevada a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Mbomekalle con algunas modificaciones (Mbomekalle et al., 2004). En este contexto, se colocaron 150 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Anedra, 99%) en un erlenmeyer, se agregaron 175 mL de agua destilada y se añadieron lentamente 125 mL de una solución 4 M de HCl bajo agitación vigorosa. Al obtenerse una solución traslúcida, se agregaron 125 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4 M y el sistema se mantuvo en ebullición a reflujo por 24 horas. Luego, se agregaron 53,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (J.T. Baker, 99.6%) para precipitar la sal. La misma se filtró y se disolvió en 300 mL de agua destilada para proceder a la purificación por recristalización. La solución se calentó a  $80^\circ\text{C}$  en un baño de glicerina, luego la sal se recristalizó en frío y se filtró.

El heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson  $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (HPA) se sintetizó mediante el intercambio iónico de la sal de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62} \cdot 13\text{H}_2\text{O}$  con una resina de intercambio iónico. Se utilizó una resina ácida Dowex HCR-W2 (Sigma-Aldrich), la cual posee una capacidad de intercambio de amonio por protones igual 2,4 mEq/g. En este contexto, un mol de la sal de amonio que pesa 4708 g, posee 6 equivalentes. Por lo tanto, para intercambiar los iones de un 1 g de la sal, que poseen 1,27 mEq, se requieren 0,60 g de resina. Con lo cual la relación estequiométrica de intercambio es para 1 g de sal de 1:0,6 masa sal: masa de resina (Matkovic et al., 2008). La metodología del intercambio consistió en colocar la masa correspondiente de resina en una columna cromatográfica a través de la cual se dejó fluir lentamente una

solución acuosa de la sal de amonio. Para intercambiar 4 g de sal, el tiempo de contacto fue de 10 a 15 min aproximadamente dejando caer gota a gota.

Las sales de Wells-Dawson de manganeso y de níquel,  $Mn_{3,4}P_2W_{18}O_{62} \cdot 31H_2O$  y  $Ni_{4,6}P_2W_{18}O_{62} \cdot 2,7H_2O$ , fueron sintetizadas previamente por este grupo de investigación a partir del heteropoliácido  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 24,8H_2O$ . Para ello, se utilizó una técnica reportada previamente mediante la cual se reemplazan los protones presentes en el HPA por metales de transición (Belghiche et al., 2009; Matkovic et al., 2019).

La síntesis involucra la mezcla de una solución acuosa de HPA, con una solución del nitrato de níquel  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (J.T. Baker, 100%) o acetato de manganeso tetrahidratado  $(CH_3COO)_2Mn \cdot 4H_2O$  (Aldrich,  $\geq 99\%$ ), las mismas contienen la cantidad estequiométrica de los metales para reemplazar todos los protones del ácido. En este contexto, para 0,500 g de  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 24,8H_2O$  se requieren soluciones con 0,0906 g de  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  o 0,076 g de  $(CH_3COO)_2Mn \cdot 4H_2O$ . La mezcla se llevó a sequedad bajo agitación y luego se calcinó a  $260^\circ C$  por 4 h, para eliminar los iones de nitrato y acetato respectivamente.

### 3.1.2 Síntesis del HPA soportado sobre dióxido de titanio $TiO_2$

El heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5H_2O$  se dispersó sobre dióxido de titanio a través de la metodología de impregnación a humedad incipiente. En particular se prepararon materiales con contenidos de 4% p/p (el cual contiene 4 mg de heteropoliácido cada 100 mg de catalizador) y 42% p/p de la fase HPA sobre el soporte oxidico. Se utilizó dióxido de titanio anatasa calcinado a  $500^\circ C$  durante 24 h. Este soporte posee una superficie específica BET de  $43,93\ m^2/g$ .

En primer término, se estableció el punto de mojado del soporte, el cual permite determinar la mínima cantidad de solvente que produce la humectación de éste. Este volumen se utilizó para solubilizar el HPA. En 0,80 mL de agua destilada (punto de mojado del soporte) se disolvió 0,0448 g de HPA para sintetizar el catalizador 4% HPA/ $TiO_2$  y 0,6600 g para 42% HPA/ $TiO_2$ , cantidades de heteropoliácido calculadas para dispersar en 1,00 g de  $TiO_2$ . Una vez disuelto se agregó el soporte mezclándolo para asegurarse una distribución homogénea del HPA en el mismo. Se dejó secar a

temperatura ambiente durante 24 horas y luego se llevó a 300°C durante 4 horas en mufla.

### **3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES**

En esta sección se presentan los fundamentos de las técnicas de caracterización utilizadas para analizar los materiales sintetizados que se especifican en las secciones 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.3, el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson y los materiales soportados 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>. La caracterización se realizó mediante espectroscopia infrarroja, superficie específica por el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET), adsorción de piridina para la determinación de la naturaleza y cantidad de sitios ácidos, análisis termogravimétrico, microscopía electrónica de barrido y microsonda de electrones, y espectroscopia de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo.

#### **3.2.1 Espectroscopia FTIR**

##### **3.2.1.1 Fundamento**

La Espectroscopia Infrarroja (IR) es una de las técnicas que permiten obtener rápida y fácilmente información sobre la estructura de compuestos orgánicos. Esto es debido a la sensibilidad del método a la composición química y la arquitectura de las moléculas. Cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar) y los diferentes grupos funcionales absorben frecuencias características de la radiación IR (Toledo, 2015).

La zona de radiación infrarroja del espectro electromagnético se encuentra entre las regiones del espectro visible y de las microondas, es decir entre 13300 y 20 cm<sup>-1</sup>. La región infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano, respecto al espectro visible. El infrarrojo medio presenta un intervalo de frecuencias entre 4000 y 400 cm<sup>-1</sup>, y es utilizado para el estudio de las vibraciones fundamentales (Conley, 1979).

Cuando una molécula absorbe radiación en esta zona del espectro electromagnético, los cambios en la energía de estas vibraciones moleculares pueden detectarse y medirse

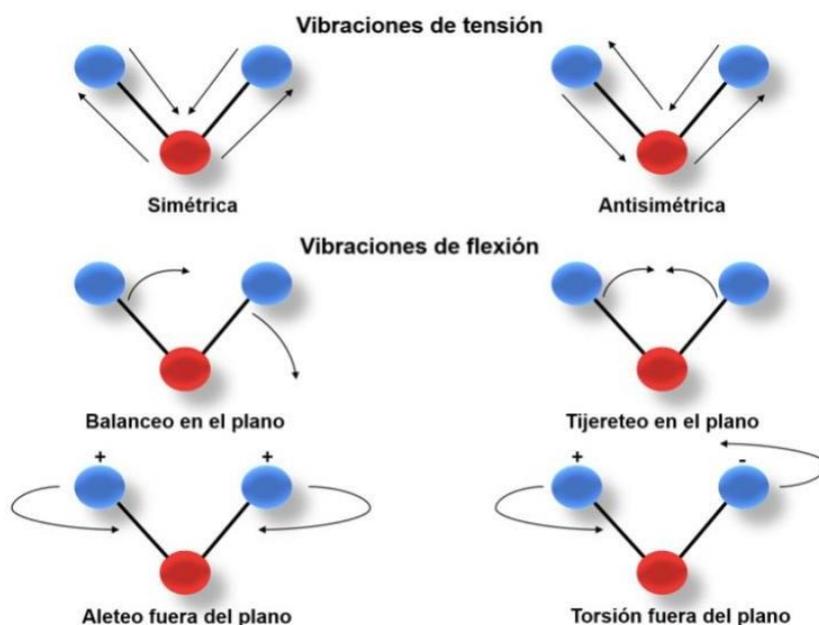
obteniendo un espectro infrarrojo. Esto ocurre cuando la energía de la radiación IR es igual a la necesaria para que se produzca una transición vibracional en la molécula, y cuando el momento dipolar cambia durante la vibración. Debido a que la frecuencia de vibración y la probabilidad de absorción dependen de la fuerza y polaridad de las uniones vibrantes, estas están influenciados por efectos intra e intermoleculares. La posición aproximada de una banda de absorción de infrarrojo está determinada por las masas vibracionales y el tipo de enlace (simple, doble o triple), el efecto de la posición exacta de aceptores o dadores de electrones del medio intra e intermolecular y por acoplamiento con otras vibraciones. La fuerza de la absorción se incrementa con el aumento de la polaridad de los enlaces de vibración.

El número total de bandas de absorción observado es generalmente diferente del número total de vibraciones fundamentales. Se reduce debido a que algunas vibraciones no son activas en IR y a que una sola frecuencia puede causar más de un tipo de vibración. Por otro lado, se generan bandas adicionales por la aparición de armónicos (múltiplos enteros de las frecuencias fundamentales de absorción), combinaciones, diferencias e interacciones de acoplamiento de frecuencias fundamentales de absorción, y las interacciones de acoplamiento entre vibraciones fundamentales y armónicos o bandas de combinación (resonancia Fermi). Las intensidades de armónicos, combinación, y bandas de diferencia son menores que las de las bandas fundamentales. La combinación y mezcla de todos estos factores crean un espectro IR único para cada compuesto (Sherman, 1997).

Las vibraciones fundamentales son siempre simétricas o asimétricas con respecto a un centro de simetría. Una vibración que es simétrica con respecto al centro de simetría es aquella para la que el vector de desplazamiento con respecto a cualquier otro átomo, cuando se refleje en el centro de simetría, coincidirá con el vector del correspondiente átomo que sea su imagen especular. Para una vibración asimétrica, cada vector de desplazamiento, cuando se refleje en el centro de simetría, será el opuesto del vector real de desplazamiento del átomo que sea su imagen especular. Las vibraciones que son simétricas al centro de simetría no pueden producir un cambio en el momento dipolar. El momento dipolar es cero para la configuración de equilibrio y permanece con dicho valor durante la vibración completa, puesto que un desplazamiento de cualquier átomo

está contrarrestado por el desplazamiento del átomo opuesto. Tales vibraciones están “prohibidas” en el infrarrojo. Por el contrario, las vibraciones asimétricas producen un cambio en el momento dipolar. El momento es cero en la posición de equilibrio, pero no es cero en ambos extremos de la vibración, y por consiguiente esta vibración es permitida en el infrarrojo (Conley, 1979).

En la Figura 3.2 se representan los distintos tipos de vibraciones moleculares. Las vibraciones de tensión, simétricas ( $\nu_s$ ) o asimétricas ( $\nu_{as}$ ), son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre los átomos. Las vibraciones de flexión, en el plano ( $\delta$ ) o fuera del plano ( $\gamma$ ) están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. Estas flexiones pueden ser de: tijera en el plano ( $\delta$ ) y de balanceo ( $\rho$ ) en el plano, o de cabeceo o aleteo ( $\omega$ ) o de torsión ( $\tau$ ) fuera del plano.



**Figura 3.2.** Tipos de vibraciones moleculares (Domínguez Capitaine et al., 2020).

La interacción entre la radiación que incide sobre la materia se explica por tres fenómenos diferentes: absorción, transmisión y reflexión. En general se cumple que la

intensidad de la luz transmitida ( $I_T$ ) es menor que la intensidad incidente ( $I_0$ ). Una fracción de  $I_0$  es reflejada ( $I_R$ ) mientras que otra es absorbida ( $I_A$ ).

La técnica más frecuentemente utilizada en la espectroscopia infrarroja es la basada en la medición de la intensidad transmitida o absorbida (técnica de transmisión). Pero también se han desarrollado técnicas que permiten medir la intensidad reflejada por una muestra como la reflectancia total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) y la reflectancia difusa (DRIFTS, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy).

Para detectar los espectros infrarrojos se emplea un espectrofotómetro de infrarrojo, basado en los mismos principios ópticos que los espectrofotómetros de ultravioleta y visible. Los tres componentes básicos que caracterizan a todos los espectrofotómetros (Figura 3.3) son: una fuente de radiación infrarroja, que suministra la iluminación incidente sobre la muestra que se estudia; un monocromador, que dispersa la energía radiante en sus muchas frecuencias, y, luego por una serie de rendijas o aberturas, selecciona la banda estrecha de frecuencias que incide sobre el detector. Este último componente transforma la energía de la banda de frecuencias en una señal eléctrica, que se amplifica lo suficiente para ser registrada (Conley, 1979).

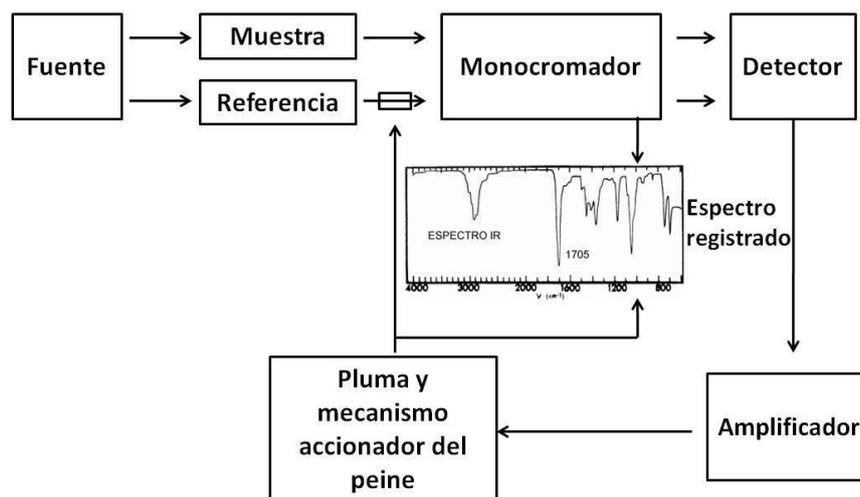


Figura 3.3. Esquema de un espectrofotómetro infrarrojo.

### 3.2.1.2 FTIR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Los instrumentos comerciales separan y miden la radiación IR empleando espectrómetros dispersivos o espectrómetros por transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared).

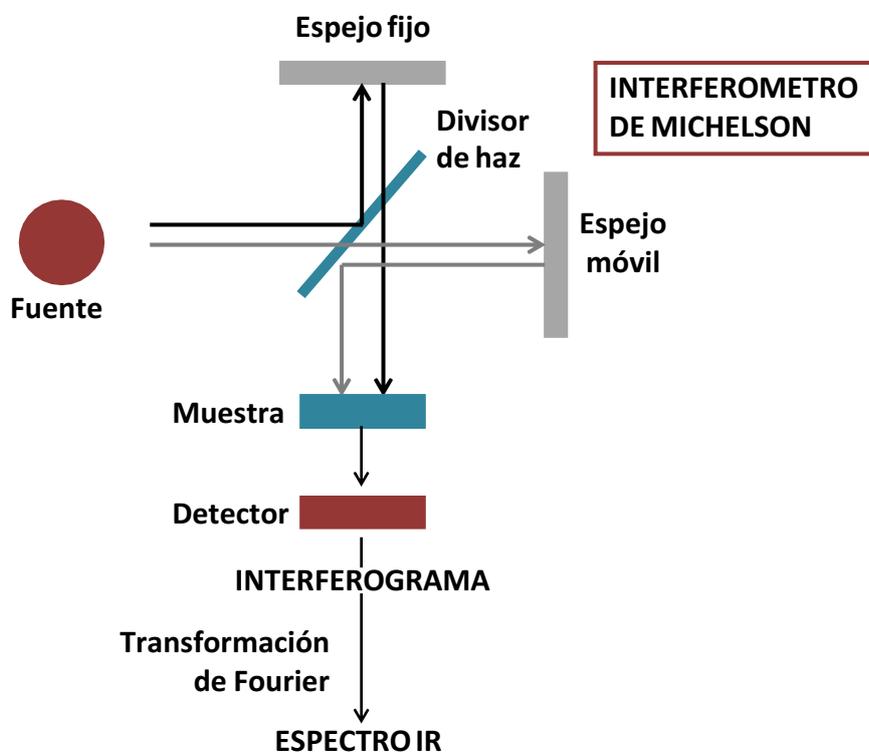
La mayoría de los equipos modernos son espectrómetros por transformada de Fourier. Su nombre proviene del hecho de que la señal del detector de estos espectrofotómetros se relaciona mediante una transformada de Fourier con el espectro medido. En un equipo FTIR hay tres componentes básicos: fuente de radiación, interferómetro y detector.

El monocromador (componente básico de los espectrofotómetros de infrarrojo) en este equipo es reemplazado por un interferómetro, el que divide la radiación incidente, genera una diferencia de camino óptico entre los haces, luego los recombina para producir señales de interferencia repetitivas medidas como función de la diferencia de camino óptico por un detector. Como su nombre lo dice, un interferograma produce señales de interferencia, las cuales contienen información de espectros infrarrojo generada al pasar por una muestra (Sherman, 1997).

El interferómetro más comúnmente usado es el interferómetro de Michelson (Figura 3.4). Está compuesto por un espejo fijo, otro móvil y un divisor de haz. Los dos espejos se encuentran perpendiculares el uno al otro, siendo el espejo móvil el que genera una diferencia de camino óptico variable entre dos haces lo cual permite dar una señal al detector que contiene la información espectral. La luz emitida de la fuente de luz se divide por un divisor de haz: aproximadamente la mitad se refleja hacia el espejo fijo y desde allí se refleja nuevamente hacia el divisor de haz donde el 50% pasa para llegar al detector (flechas negras en la Figura 3.4). La otra mitad de la luz inicial pasa el divisor de haz en su primer encuentro, se refleja por el espejo móvil nuevamente al divisor de haz donde el 50% se refleja hacia el detector (flechas grises en la Figura 3.4). Ambos haces se recombinan. Esta recombinación da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la diferencia de camino óptico. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede la absorción selectiva de longitudes de onda, y finalmente llega al detector. El equipo mide la intensidad de luz relativa a la posición del espejo móvil y toma el interferograma. Es decir, que un

interferograma es el registro de la señal de interferencia, es un espectro dependiente del tiempo que registra intensidad en función del tiempo en el espejo móvil. Luego se lleva a cabo una operación matemática conocida como la transformación de Fourier, la cual convierte el interferograma a un espectro IR, el cual es un espectro dependiente de la frecuencia que grafica intensidad en función de la frecuencia (Sherman, 1997; Barth, 2007).

La principal ventaja de estos espectrómetros por transformada de Fourier es la velocidad y sensibilidad con respecto a los espectrómetros dispersivos. Además, permiten examinar todas las frecuencias en simultáneo y presentan una alta relación señal/ruido (Toledo, 2015).



**Figura 3.4.** Esquema de un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (Barth, 2007).

El equipo utilizado en este trabajo fue un Bruker Vertex 70, en el cual se midieron los espectros en el rango  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.1.3 Caracterización del ácido fosfotúngstico de Wells Dawson másico y soportado por espectroscopia infrarroja

En este trabajo de investigación, la espectroscopia infrarroja principalmente se utilizó para identificar y determinar semi-cuantitativamente la presencia de ácidos grasos en fase líquida según se describirá en el Capítulo 4. Adicionalmente, esta espectroscopia permitió estudiar la estructura del heteropolioxoanión de Wells Dawson del ácido fosfotúngstico másico y soportado sobre anatasa, y de las heteropolisales derivadas. En este contexto, la vibración de estiramiento del enlace fósforo-oxígeno P-O perteneciente al anión  $P_2W_{18}O_{62}^{-6}$  a los  $1091\text{ cm}^{-1}$ , constituye una “huella dactilar” del anión que permite identificarlo inequívocamente. Asimismo, la estructura del tipo Wells Dawson posee señales en  $960$ ,  $914$  y  $783\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las especies W-O que forman la estructura alrededor de las especies centrales del fósforo (Matkovic, 2009).

### 3.2.2 Determinación de la superficie específica por el método BET

#### 3.2.2.1 Fundamento

La metodología que permite determinar la superficie específica de un material a través de la adsorción de un gas se fundamenta en que un sólido expuesto a un gas dentro de un espacio cerrado a una presión y temperatura definidas, comenzará a adsorberlo disminuyendo gradualmente la presión del sistema. La cantidad de gas adsorbido por gramo de sólido dependerá de la presión del gas en el equilibrio, de la temperatura y de la naturaleza del gas y del sólido. La isoterma de adsorción permite establecer el área específica, el volumen y la distribución de tamaño de poros del material. Los gases comúnmente utilizados para obtener las isotermas de adsorción de un material son: nitrógeno, argón, agua o alcoholes, siendo el primero el más usado. El mecanismo de adsorción es de tipo fisisorción y ocurre en primer lugar con el llenado del volumen de microporos, en caso de que haya presentes, seguido por adsorción física capa por capa en meso y macro poros, lo cual permite obtener datos experimentales (Aguilar Rios & Salmones Blásquez, 2003).

### 3.3.2.2 Teoría de Langmuir

En 1916, Irving Langmuir postuló un modelo de adsorción que condujo a la utilización de la adsorción física como técnica con aplicación a la medida de áreas superficiales. La ecuación de Langmuir relaciona la adsorción de moléculas en una superficie sólida con la presión del gas a una temperatura constante. Este modelo postula que la superficie de los sólidos adsorbentes es energéticamente homogénea, la adsorción ocurre solo en una monocapa, no existe ningún tipo de interacción entre las moléculas adsorbidas, se establece un equilibrio dinámico de adsorción-desorción y se considera que el único componente adsorbido es el soluto. El modelo de Langmuir cuya ecuación se presenta en (3.1) es aplicable a los resultados de la adsorción en monocapa sobre superficies sólidas homogéneas, pero no a los correspondientes a la adsorción en multicapas o sobre superficies energéticamente heterogéneas.

La ecuación que describe el modelo de Langmuir se presenta a continuación:

$$\theta = \frac{K_A p_A}{1 + K_A p_A} \quad (3.1)$$

donde  $\theta$  representa la fracción de recubrimiento,  $K_A$  es la constante de equilibrio y  $p_A$  es la presión del gas presente (Atarés Huerta, 2022).

Posteriormente, se propusieron otros modelos de adsorción más generales como son los de Freundlich, Temkin, Hill, Dubinin-Radushkevich, Guggenheim-Anderson-de Boer GAB, Brunauer-Emmett y Teller (BET), entre otros (Pila, 2020). Éstos consideran la existencia de multicapa, de interacciones laterales de las moléculas adsorbidas, su movilidad y la heterogeneidad energética de la superficie del sólido.

### 3.2.2.3 Modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET)

En 1938 con la finalidad de encontrar un modelo adecuado para describir las isotermas de la adsorción en multicapas sobre superficies homogéneas, se propuso la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller (BET) (Brunauer et al., 1938). Esta ecuación se puede considerar una generalización de la de Langmuir, que incluye la formación de un número finito de capas monomoleculares sobre la primera (unida directamente a la superficie del sólido).

En la ecuación de BET se supone que el calor de adsorción es igual al calor de evaporación del gas y que en todas las monocapas el valor de la relación entre las velocidades específicas de adsorción y de desorción es el mismo. El modelo de BET es útil en la zona de bajas presiones relativas, pero en la zona de presiones muy bajas en general se desvía negativamente y en la de altas presiones positivamente debido al llenado de los microporos. Con el objetivo de corregir estas desviaciones, surgieron nuevas ecuaciones que derivan de este modelo.

Las ecuaciones de Langmuir y de BET se aplican a isothermas de sistemas relativamente sencillos y permiten, dentro de sus limitaciones, calcular el área superficial de los sólidos que es accesible al adsorbato. La expresión de la ecuación BET es la siguiente:

$$\frac{P}{V_{ads}(P_0 - P)} = \frac{1}{CVm} + \frac{(C - 1)P}{CVmP_0} \quad (3.2)$$

donde P es la presión de equilibrio del gas en la superficie, P<sub>0</sub> es la presión de vapor de saturación, V<sub>ads</sub> es el volumen de gas adsorbido sobre la muestra sólida en CNTP, V<sub>m</sub> es el volumen de gas en CNTP correspondiente a la formación de la monocapa y C es la constante relacionada con la probabilidad de adsorción-desorción.

Esta ecuación provee una adecuada descripción para materiales microporosos (0,35 a 2 nm), mesoporosos (2 a 50 nm) y macroporosos (> 50 nm) en un rango limitado de presiones relativas, usualmente entre 0,05 y 0,3. Por debajo de 0,05, el principio de homogeneidad energética de la superficie no es aplicable en la mayoría de los absorbentes, y por encima de 0,3 deben considerarse las interacciones laterales de las moléculas, lo que no sustenta la teoría BET (Matkovic, 2009).

Mediante el uso de un sortómetro es posible determinar la superficie específica mediante el método BET, la superficie de Langmuir, el volumen total de poros, el volumen total de microporos, el área por el método t-Plot y la distribución de tamaño de mesoporo BJH (Barett-Joyner Halenda) mediante un método no destructivo.

La determinación de la superficie específica de los materiales utilizados en este trabajo se realizó en un sortómetro marca Micromeritics, modelo ASAP 2020, con nitrógeno como adsorbato. La metodología involucra el desgasado *in situ* de la muestra

(típicamente, 0,5 g) que se somete a 100°C bajo vacío (<30  $\mu\text{m Hg}$ ) durante 12 h. Luego, se enfría a -195,80°C con nitrógeno líquido y se somete a presiones de nitrógeno entre 3 y 760 mm Hg a temperatura constante. En cada caso, se determina el volumen de gas adsorbido por gramo de muestra en  $\text{cm}^3/\text{g}$ . A partir de estos datos se construyen las isotermas de adsorción que representan la cantidad adsorbida versus la presión relativa que es el cociente entre la presión absoluta del sistema y la de saturación.

### 3.2.3 Investigación de la naturaleza y concentración de sitios ácidos por adsorción de piridina

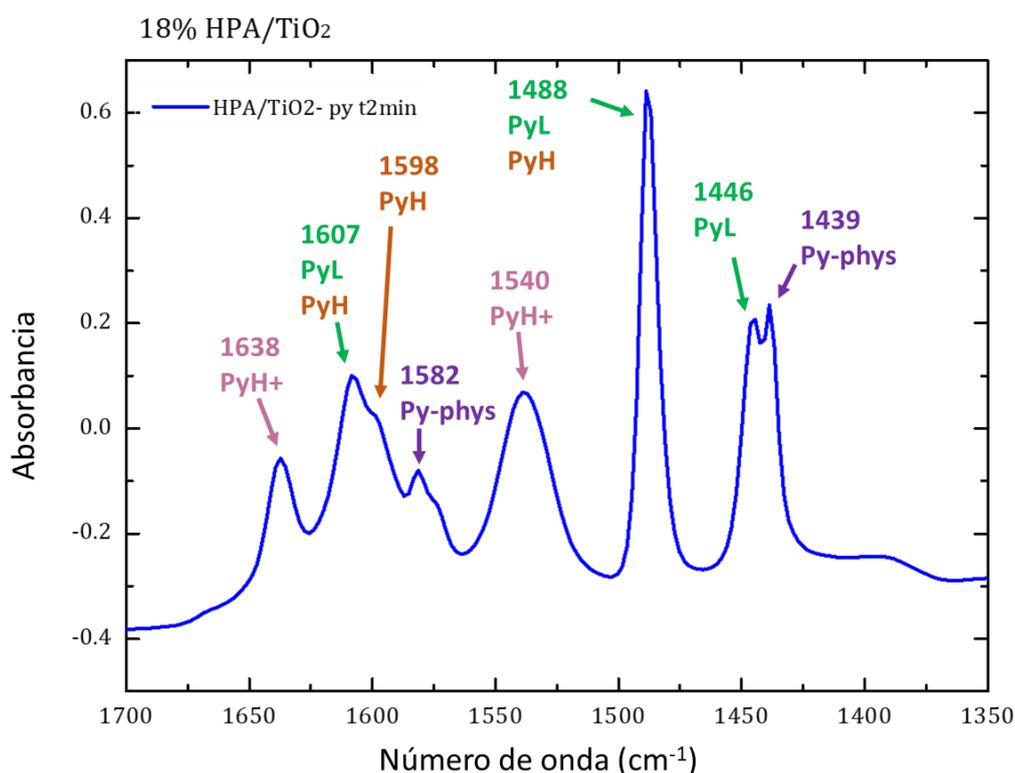
Las propiedades ácidas de los heteropolicompuestos, como los heteropoliácidos fosfotúngsticos de Wells-Dawson y sus sales, se atribuye a una red de especies  $\text{H}^+$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) $_n$  que se descomponen en especies hidronio  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  a 200°C y en sitios ácidos de tipo Brønsted alrededor de los 300°C (Sambeth et al., 2003; Matkovic et al., 2015). Con el fin de investigar la naturaleza y concentración de los materiales heteropoliácidos cuya síntesis se describió en la sección 3.1., se realizó la adsorción de piridina y el análisis infrarrojo de las especies generadas por la interacción de la molécula sonda con los sitios activos de los materiales.

La piridina (Py), molécula sonda comúnmente utilizada para el estudio de las propiedades ácidas superficiales de los materiales, permite determinar el número y naturaleza de sitios ácidos Brønsted y Lewis presentes en la superficie de materiales sólidos. La piridina interacciona con los materiales de diferentes maneras, una por simple fisorción, generando la especie Py-phys, o bien puede quimisorberse sobre la superficie. En el caso de quimisorberse, dependiendo de la naturaleza de los sitios ácidos con los que interacciona se generan distintas especies adsorbidas (Parry, 1963; <sup>b</sup>Matkovic et al., 2019). La molécula de piridina se protona en presencia de ácidos fuertes de tipo Brønsted ( $\text{PyH}^+$ ). y, por otro lado, su par electrónico disponible actúa como ligando dador sobre sitios coordinativamente insaturados que constituyen centros ácidos de Lewis ( $\text{PyL}$ ), e interactúa con los grupos hidroxilos superficiales formando puentes de hidrógeno ( $\text{Py-H}$ ).

Con el fin de determinar la naturaleza (Lewis y/o Brønsted) y la concentración de los sitios ácidos se realizaron estudios de adsorción de piridina mediante análisis

espectroscópico. El estudio de las especies adsorbidas se realizó específicamente por espectroscopia infrarroja *in situ*. La adsorción y el calentamiento de la molécula sonda se realizan *in situ* para correlacionar la evolución de la acidez con la temperatura de desorción.

Las especies  $\text{PyH}^+$  presentan señales infrarrojas en  $1638$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$ , las  $\text{PyL}$  en  $1607$ ,  $1488$  y  $1446\text{ cm}^{-1}$ , enlaces de puente hidrógeno ( $\text{Py-H}$ ) en  $1607$ ,  $1598$  y  $1488\text{ cm}^{-1}$ , además de poder diferenciar los anteriores de la piridina fisisorbida ( $\text{Py-phys}$ ) en  $1582$  y  $1439\text{ cm}^{-1}$ , como se muestra en la Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Espectro infrarrojo de la adsorción de piridina en el heteropoliácido de Wells-Dawson dispersado sobre TiO<sub>2</sub> en un 18% p/p.

La metodología utilizada en los experimentos de adsorción de piridina involucró la preparación de pastillas y para realizar las mismas con un peso comparable, se pesaron aproximadamente 35 mg de muestra y se les ejerció una presión de  $5\text{ ton}\cdot\text{cm}^{-2}$  formándose pastillas de 12 mm de diámetro. Las pastillas se colocaron en una celda especialmente diseñada que permite el tratamiento térmico de las muestras y la quimisorción de piridina. La celda se ubica entre ventanas de CaF<sub>2</sub> en el interior de un

espectrofotómetro infrarrojo. Las ventanas se mantienen refrigeradas durante el estudio. A su vez, la celda está conectada a un sistema convencional de vacío y/o flujo de gases, que permite hacer fluir una corriente de nitrógeno de  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a temperatura ambiente durante 60 minutos para eliminar el agua adsorbida en el material a estudiar. Una vez verificada la eliminación del agua fisisorbida a través del análisis infrarrojo, se procedió a la dosificación de piridina.

El estudio de sitios ácidos se realizó colocando la pastilla en la celda bajo flujo de  $\text{N}_2$  a  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , se aumentó la temperatura usando una rampa de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta llegar a los  $300^\circ\text{C}$ , se mantuvo a esta temperatura durante 10 min y se cortó el calentamiento. Se dejó enfriar y al llegar a  $30^\circ\text{C}$  se inyectó  $1 \mu\text{l}$  de piridina líquida en una zona calefaccionada para que se evapore bajo flujo de  $\text{N}_2$  y sus vapores entren en contacto con la muestra. Luego, se purgó con el mismo gas inerte, hasta que las bandas de interés se mantuvieron estables a los 60 min aproximadamente. La cuantificación de los sitios ácidos superficiales del tipo Lewis y Brønsted se realizó de acuerdo con los coeficientes integrados de extinción molar reportados en la literatura (Tamura et al., 2012). Se utilizó un espectrómetro Nicolet Magna 550 FTIR con un detector MCT criogénico para adquirir los espectros (resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 100 barridos).

### 3.2.4 Análisis termogravimétrico

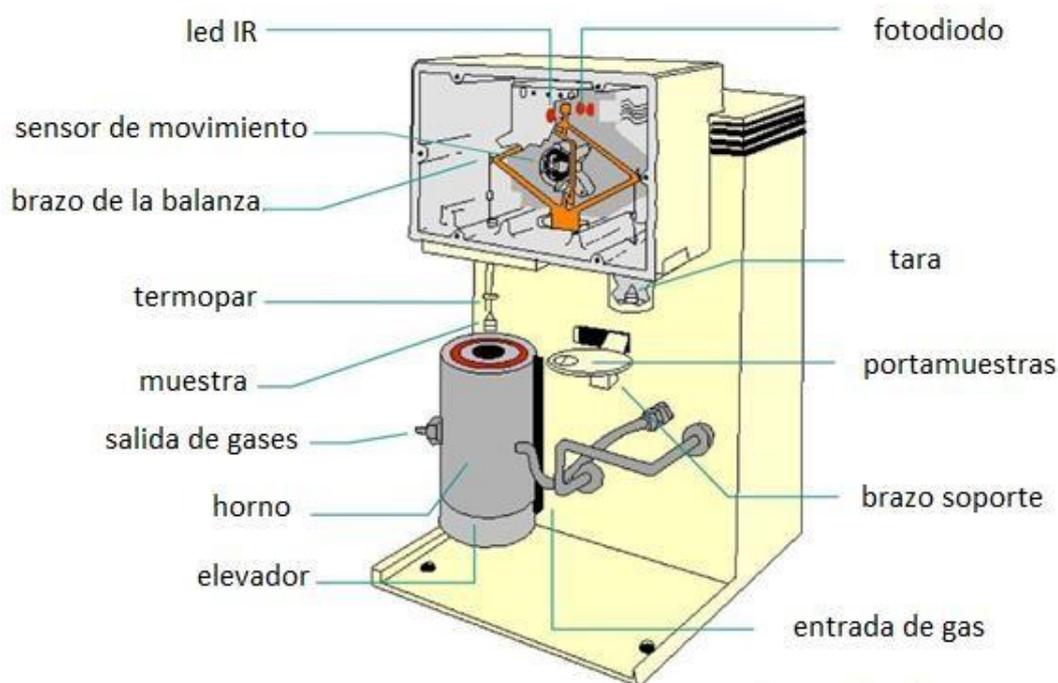
El análisis por termogravimetría, conocido comúnmente como TGA (thermogravimetric analysis), se define como la técnica mediante la cual se mide el porcentaje del peso de una muestra en función del tiempo o de la temperatura, mientras se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado y los gases más habituales son  $\text{N}_2$ , aire, Ar,  $\text{CO}_2$ , también se usan  $\text{H}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , o  $\text{SO}_2$  (Granados Cristancho, 2015).

Este análisis consiste en registrar continuamente la variación de la masa del material estudiado conforme se varía la temperatura de manera constante (cambio de temperatura lineal), este procedimiento es conocido como análisis dinámico. También es posible hacer un análisis termogravimétrico isotérmico, en el cual se mantiene la temperatura constante por un periodo establecido (Rodríguez, 2012).

Como resultado del análisis termogravimétrico se obtienen los datos de cambio de masa con respecto a la temperatura o al tiempo y un termograma, el cual representa gráficamente las variaciones porcentuales de la masa y a partir de estas se obtienen las curvas del análisis termogravimétrico diferencial (DTG).

La termogravimetría se puede utilizar para seguir reacciones en la que se producen cambios en la masa (pérdidas o ganancias) por descomposición o reacción con otras especies. Es un método utilizado para determinar la composición de los materiales y predecir su estabilidad térmica hasta los 1000°C, su estabilidad oxidativa, estimar el tiempo de vida de un producto, para estudiar la descomposición cinética de distintos materiales, el efecto de atmósferas reactivas, analizar el contenido de volátiles y de humedad presente en los materiales, etc. (Barrios, 2019).

Las partes principales del equipo son la balanza, el horno, los sensores de temperatura y la plataforma de la muestra (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Balanza termogravimétrica convencional (Barrios, 2019).

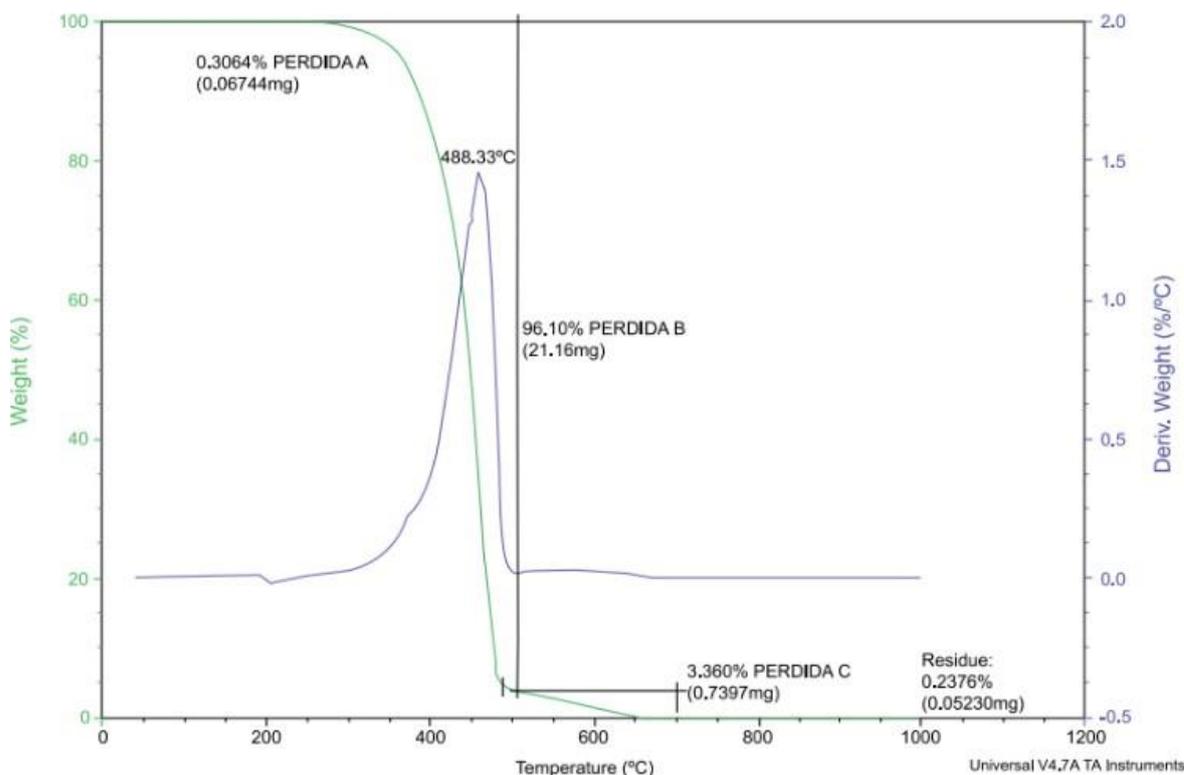
La balanza registra la masa inicial de la muestra, los cambios de la misma, así como también la masa final. Esta tiene un aislamiento térmico que evita ser afectada por la

temperatura. La balanza de modo nulo es la más utilizada en esta técnica, en la cual el equilibrio físico se establece en una posición nula antes de comenzar el análisis. Cualquier disminución en la masa de la muestra inicial conduce a una alteración en el nivel nulo del equilibrio físico iniciando un mecanismo de corriente eléctrica a través de fotodiodos, generando que la balanza vuelva a su posición nula. La cantidad de corriente eléctrica utilizada para restablecer el equilibrio a su nivel inicial depende de la variación de la masa, este cambio es cuantificado y los datos son enviados al software de la computadora, donde la señal eléctrica se transforma en una curva derivada termogravimétrica.

El horno provee la temperatura de análisis y regula la variación de la misma. Contiene sensores que registran la temperatura y evita que el sistema supere la temperatura indicada. El horno debe proporcionar un calentamiento homogéneo, alcanzar una temperatura de 100 o 200°C por encima de la temperatura de trabajo y debe ser capaz de una rápida respuesta, así como de calentar y enfriar con un amplio rango de velocidades. Además, el calor del horno no debe afectar el mecanismo de la balanza y las paredes del mismo deben ser inertes al gas utilizado y a las sustancias desprendidas en todas las temperaturas usadas (Rodríguez, 2012; Granados Cristancho, 2015).

La plataforma de muestras permite que estas sean cargadas automáticamente. La muestra es trasladada por un mecanismo de transporte desde la plataforma de muestras hasta la cámara del horno.

En el termograma, o curva termogravimétrica, se obtiene una curva que representa la pérdida de masa de la muestra, en porcentaje o miligramos, en función de la temperatura o el tiempo (Rodríguez & Villegas, 2012). En la Figura 3.7 se presenta el termograma correspondiente a una muestra de  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  donde se puede ver la pérdida de masa a distintas temperaturas (curva verde). Además, el software permite señalar los cambios de pendiente de la curva mediante la primera derivada de la masa en función de la temperatura (curva azul), la cual indica la velocidad de variación de la masa (Barrios, 2019).



**Figura 3.7.** Curva termogravimétrica (Rodríguez & Villegas, 2012)

El análisis termogravimétrico del heteropoliácido sintetizado se llevó a cabo con un equipo Shimadzu TGA 50. Se analizó una muestra de heteropoliácido másico y para ello, se colocaron 6,06 mg en un portamuestra de aluminio, desde temperatura ambiente hasta 750°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C.min<sup>-1</sup> bajo flujo de helio a 250 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.2.5 Microscopía electrónica de barrido y microanálisis por dispersión de energías de rayos-X

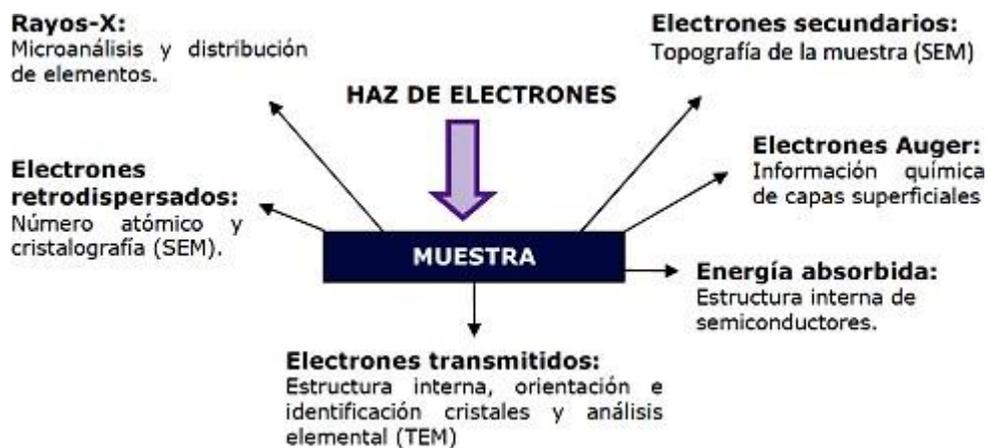
El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) es uno de los instrumentos más utilizados para el análisis de características microestructurales de materiales sólidos. Este microscopio presenta una alta resolución, de 20 a 50 Å, y como producto de su gran profundidad de foco se obtienen imágenes de apariencia tridimensional. Esta técnica permite un análisis subsuperficial del sólido ya que alcanza una profundidad de hasta 100 nm, medidos desde la superficie hasta el interior del sólido. En general, estos equipos cuentan con un detector de rayos X dispersivo en

energías (EDS, Energy Dispersive Spectrometer, también conocido como EDX), que permite obtener información composicional de manera rápida y eficiente (Kang et al., 2013).

El primer SEM fue desarrollado en 1938 por Von Ardenas, mientras que el SEM comercial moderno surgió en la década de 1950 a través de un extenso desarrollo llevado a cabo por el Profesor Sir Charles Oatley y estudiantes de la Universidad de Cambridge. Esta técnica es utilizada actualmente para obtener información estructural de muestras sólidas, entre ellas, porosidad, rugosidad, forma y tamaños de partículas o cristales, diámetros de poros, espesores de capas, longitud de fibras, presencia y distribución de elementos químicos y análisis cuantitativo (Goldstein et al., 2018; Montoro, 2019).

### 3.2.5.1 Fundamento

La interacción de los electrones con la materia da origen a la microscopía electrónica. Según el tipo de interacción obtendremos diferente información de la muestra analizada, como se ve en la Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Tipos de interacción e información obtenida de acuerdo a la interacción entre un haz de electrones y un material sólido (Colonia Surichaqui, 2013).

El haz de electrones primarios que incide sobre la muestra a analizar puede inducir la salida de electrones de niveles electrónicos internos. Un electrón puede interactuar tanto con el núcleo como con los electrones de un átomo, y como consecuencia de esta interacción puede cambiar la dirección de la trayectoria del electrón incidente, generando un fenómeno denominado dispersión.

Las interacciones electrónicas pueden ser de tipo elásticas o inelásticas. Las primeras afectan las trayectorias de los electrones del haz primario dentro de la muestra sin alterar sus energías cinéticas y ocurre cuando un electrón primario se encuentra dentro del rango del campo electrostático de un núcleo atómico. El electrón se dispersa debido a la atracción coulombiana del núcleo, desviándose de su trayectoria en un ángulo  $\phi$ , el cual puede estar entre  $0^\circ$  y  $180^\circ$ , pero en general es de  $2^\circ$  a  $5^\circ$ . En cambio, en las interacciones inelásticas, hay una disminución de la energía cinética de la partícula que interacciona con la muestra. La energía transferida en la colisión ocasiona la expulsión de electrones provenientes del material, o bien la emisión de radiación electromagnética, lo cual proporciona información sobre el material (Kang, 2020).

Cuando el electrón incidente interacciona con los electrones más periféricos de los átomos de la muestra, muchos de estos electrones de valencia son eyectados fuera del espécimen como *electrones secundarios*. Estos electrones son de muy baja energía, por lo que deben encontrarse muy cerca de la superficie para poder escapar. Precisamente por eso proporcionan una valiosa información topográfica de la muestra.

Si la interacción ocurre cerca del núcleo de los átomos, los electrones son dispersados elásticamente en sentido contrario y eyectados fuera de la muestra, los denominados *electrones retrodispersados* o "*backscattered*". La intensidad de este efecto varía proporcionalmente con el número atómico de la muestra, por lo tanto, permiten obtener un mapa con información sobre la composición superficial. Esto puede explicarse matemáticamente mediante el coeficiente  $\eta$  que es la relación entre el número de electrones retrodispersados emitidos  $\eta_{\text{BSE}}$  y el número de electrones primarios  $\eta_{\text{PE}}$ , y aumenta con el número atómico  $Z$  proporcionando un mecanismo de contraste que permite distinguir diferentes materiales.

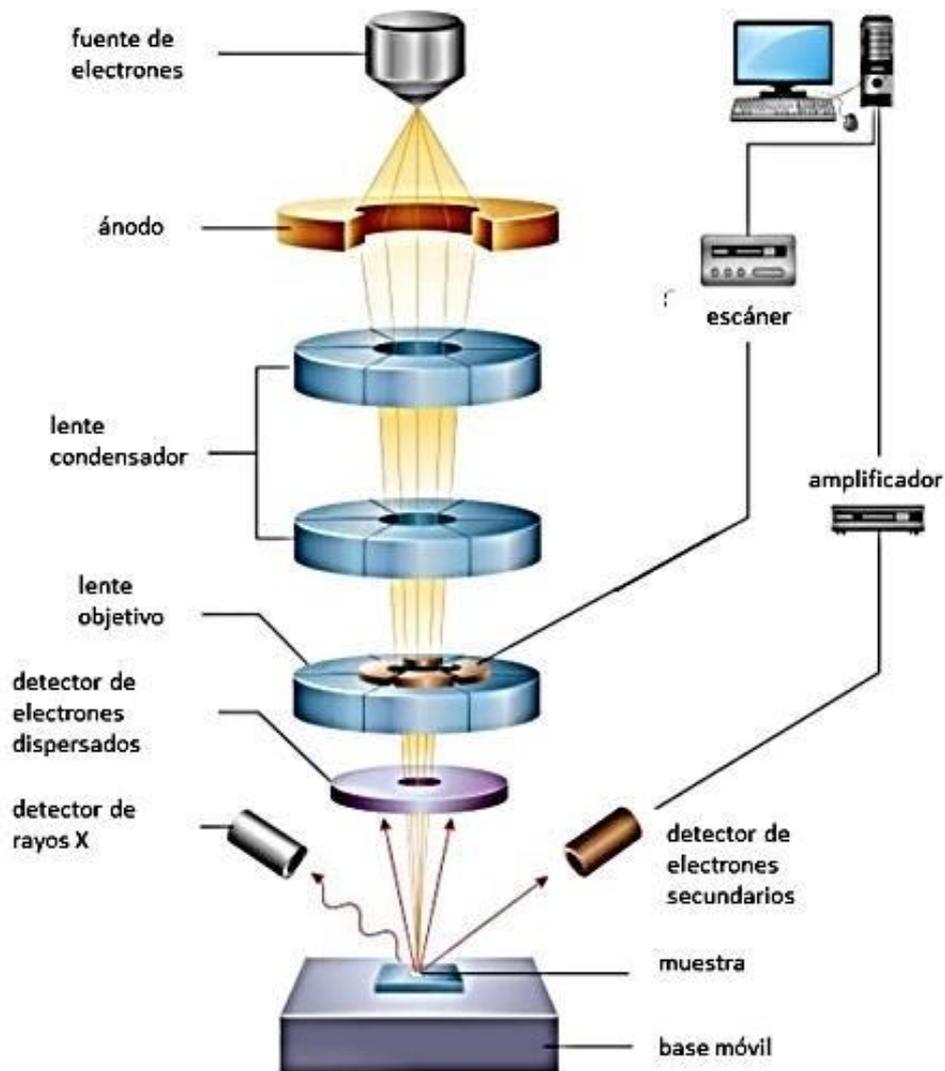
Cuando un electrón secundario es expulsado del átomo, otro electrón más externo puede saltar hacia el interior y cubrir ese hueco. El exceso de energía provocado por

este desplazamiento puede ser corregido emitiendo un nuevo electrón de la capa más externa. Estos son los llamados electrones *Auger*, y son utilizados para obtener información sobre la composición de pequeñísimas partes de la superficie de la muestra.

A partir de la interacción inelástica de los electrones incidentes con los electrones de las capas más internas del átomo es posible obtener el *espectro de rayos X de líneas características* de los elementos presentes en la muestra. Debido a que estos son característicos de cada elemento de la muestra, se utilizan para obtener información sobre la composición de la misma. A diferencia de los electrones Auger, los rayos X proporcionan información analítica de un volumen considerable de la muestra.

Si la muestra es muy delgada, muchos de los electrones incidentes pueden atravesarla. Estos *electrones transmitidos*, los cuales pueden ser dispersados o no, dan lugar a diferentes señales en lo que se conoce como modo STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy).

Debido a las interacciones complejas del haz de electrones con los átomos del espécimen se producen una amplia variedad de señales como hemos visto anteriormente. Las señales generadas por los electrones secundarios y retrodispersados son colectadas en la cámara portamuestras del microscopio. En este sentido, las imágenes topográficas provienen de la detección de electrones secundarios, mientras que a partir de las señales obtenidas de los electrones retrodispersados se obtienen imágenes con contraste composicional.



**Figura 3.9.** Partes principales del equipo utilizado para la microscopía SEM (Ali, 2020).

En la Figura 3.9 se puede ver un diagrama del equipo utilizado para la microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión de rayos X (EDS), donde se distinguen sus principales componentes. La fuente de electrones consta de un filamento de tungsteno que se calienta produciendo un haz de electrones. El filamento está rodeado por el cilindro de Wehnelt que obliga a los electrones a focalizarse en una pequeña región de entre 25 y 100  $\mu\text{m}$ . Debajo de este se encuentra un ánodo que puede polarizarse hasta un potencial de 50kV. Las lentes condensadoras que controlan la corriente del haz, mientras que la lente-objetivo concentra el haz hasta una sección mínima, que puede variar de 1 a 500 nm (Kang, et al., 2013).

### 3.2.5.2 Preparación de la muestra

Los microscopios electrónicos de barrido trabajan a alto vacío, aproximadamente a  $10^{-6}$  torr, o bajo vacío, aproximadamente a 0,01 a 1 torr. Los nuevos microscopios electrónicos de barrido (ESEM, Environmental Scanning Electron Microscope) tienen la capacidad de trabajar con bajo vacío (hasta 20 torr), aumentando notablemente el campo de aplicación, permitiendo estudiar muestras con un 100% de humedad relativa.

Las muestras conductoras pueden ser analizadas sin pretratamiento, pero en el caso de las no conductoras; como las biológicas, vidrios, polímeros, compuestos orgánicos, etc.; necesitan una cubierta conductora metálica, para evitar carga eléctrica y daño por radiación. Este daño es irreversible y puede ocurrir antes o durante la microscopía. Típicamente se utiliza una cubierta de oro debido a que es un buen conductor del calor y la electricidad, o se recubren con carbono si se quiere realizar análisis químico por EDS (Kang et al., 2013).

En este trabajo se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental, FEI Quanta 200, que se encuentra en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física “Ing. Gregorio Cusminsky” (LIMF), de la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata (Figura 3.10). Las superficies fueron analizadas con una magnificación de 300x a 8000x bajo condiciones de bajo vacío.



**Figura 3.10.** Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental, FEI Quanta 200 del LIMF.

Se utilizó la microscopía SEM con el objetivo de estudiar la estructura del heteropoliácido de tipo Wells-Dawson soportado sobre dióxido de titanio en un 42% HPA/TiO<sub>2</sub> (su preparación fue descrita en la sección 3.1.2). Se realizó el estudio del material antes de ser usado como catalizador y luego de usarse en cuatro ciclos en la transesterificación de aceite usado en cocción. Para ello, el mismo fue separado del medio de reacción mediante filtración y fue lavado con n-heptano y secado a 30°C durante 24 horas en estufa. Posteriormente, fue secado a 100°C por 2 horas.

### 3.2.5.3 Microanálisis elemental por dispersión de energías de rayos-X

A fin de corroborar la cantidad dispersada y la distribución del heteropoliácido de Wells-Dawson sobre dióxido de titanio, se llevó a cabo un análisis cualitativo y semicuantitativo mediante una microsonda de dispersión de energías de rayos X de los materiales soportados 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>. Estos estudios se realizaron a 0,6 torr y 20 kV con un equipo EDAX SDD Apollo 40, acoplado a un microscopio ESEM FEI Quanta 200. El cual se muestra en la Figura 3.11.



**Figura 3.11.** Espectrómetro de rayos X dispersivo en energías EDAX SDD Apollo 40.

### 3.2.6 Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo

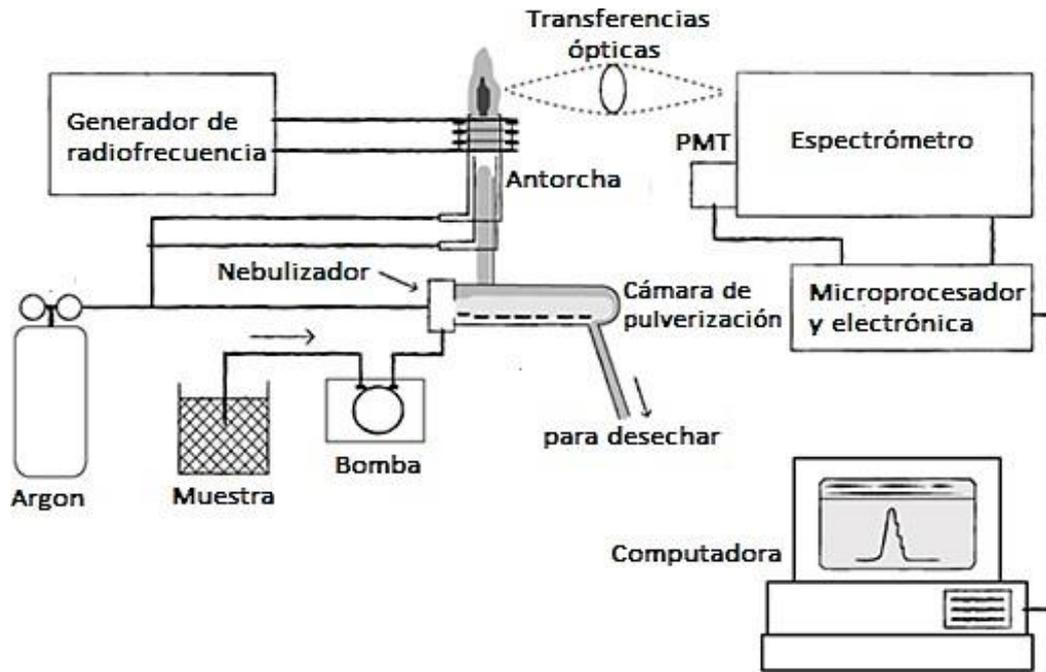
Esta técnica permite la detección y cuantificación de la mayoría de los elementos de la tabla periódica en concentraciones de hasta ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) (Espectrometría de Emisión Atómica ICP-OES, 2019). Tiene múltiples aplicaciones como la determinación de metales y otros componentes en suelos y aguas, en análisis clínicos mediante la detección de elementos tóxicos en orina, sangre, tejidos, etc., así como también en la industria alimenticia y la determinación de la procedencia de sedimentos y rocas a través de su composición (Jiménez Heinert et al., 2020).

En esta Tesis se estudió la posible lixiviación al medio de reacción del HPA soportado en  $\text{TiO}_2$  en el medio de reacción a través de la determinación de la concentración de tungsteno mediante un estudio de plasma acoplado inductivamente utilizando Espectroscopía Óptica de Emisión (ICP-OES) detallado a continuación.

#### 3.2.6.1. Fundamento

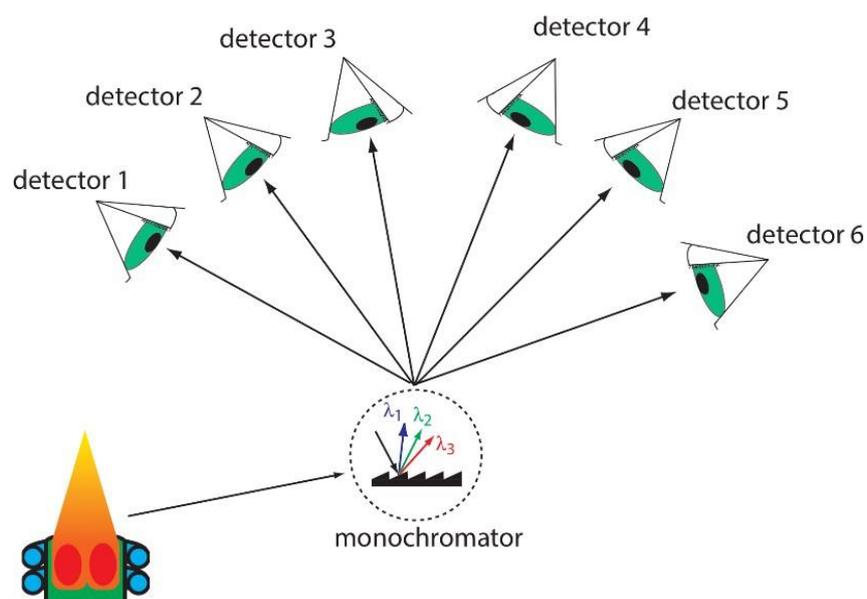
La ICP-OES se fundamenta en la emisión espontánea de fotones de los átomos, los cuales han sido excitados por un plasma de argón de alta temperatura (6800 K). Las señales obtenidas son características de cada elemento y proporcionales a la concentración en ciertas condiciones.

Para llevar a cabo este análisis, la muestra es transportada en forma líquida mediante una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol por medio de la acción de gas argón. Este aerosol es conducido a la zona de ionización la cual consiste en un plasma que es generado por la acción de un campo magnético sobre un flujo de argón y produce iones de argón y electrones. Estos iones, al retornar a su estado elemental, emiten radiaciones de una longitud característica de cada elemento. Esta radiación es separada según su longitud de onda en un sistema óptico antes de pasar por el detector donde se mide la intensidad de cada una y se relaciona con la concentración de cada elemento en la muestra. En la Figura 3.12 se presenta el diagrama esquemático de un ICP-OES con las partes principales del equipo.



**Figura 3.12.** Diagrama de un Espectrómetro de Emisión Atómica (Levine, 2021)

La espectroscopia de emisión atómica permite el análisis multielemental ya que todos los analitos de una muestra se excitan simultáneamente. Si el instrumento incluye un monocromador de barrido, es posible programarlo para realizar el análisis secuencial permite de 3 o 4 analitos por minuto. En caso de contar con un instrumento multicanal se puede monitorear simultáneamente múltiples analitos, ya que cuenta con varios detectores colocados en una matriz semicircular alrededor del monocromador en posiciones que corresponden a las longitudes de onda de los analitos, como se ve en la Figura 3.13. Estos instrumentos pueden contener hasta 60 detectores (Harvey et al., 2016).



**Figura 3.13.** Diagrama esquemático de un espectrómetro de emisión atómica multicanal (Harvey et al., 2016).

En este trabajo se utilizó un equipo Shimadzu ICPE-9800 (Figura 3.14) presente en el Laboratorio UPL, siguiendo la normativa EPA 6010. Para ello, las muestras fueron sometidas a una digestión en un digestor por microondas QLAB Pro Question Technologies Corp., con ácido nítrico a 400 W y 200°C por 15 min, de acuerdo a la normativa US EPA SW-3052.



**Figura 3.14.** Espectrómetro de Emisión Atómica ICPE Simultaneo Shimadzu ICPE-9800.

A partir del análisis de tungsteno en solución se determinó el porcentaje de heteropoliácido lixiviado luego de las reacciones en diferentes condiciones de temperatura, velocidad de agitación y tiempo de reacción.

### 3.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar Ríos, G.; Salmones Blásquez, J. (2003). Fundamentos de Catálisis. Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. Distrito Federal, México.
- Ali, A. S. (2020). Application of Nanomaterials in Environmental Improvement en M. Sen (Ed.), Nanotechnology and the Environment. IntechOpen.
- Atarés Huerta, L. M. (2022). Isoterma de Langmuir. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Barrios, C. (2019). Laboratorio de Análisis Térmico (LAT) Usos y Aplicaciones. Ciclo de Seminarios Internos «Dr. Alberto Cassano». Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), Santa Fé, Argentina.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1767, 1073-1101.
- Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309.
- Belghiche, R.; Bechiri, O.; Abbessi, M.; Golhen, S.; Le Gal, Y.; Ouahab, L. (2009). 2D and 3D Polymeric Wells-Dawson poly-oxometalates: Synthesis, crystal structures, and cyclic voltammetry of  $[(M(H_2O)_4)_x][H_{6-2x}P_2W_{18-n}Mo_nO_{62}]$  (M = Cu(II), Co(II), Ni(II)). *Inorg. Chem.* 48, 6026–6033.
- Colonia Surichaqui, R.C. (2013). Síntesis y Caracterización de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> y su actividad antimicrobiana [Tesis de grado, Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Ciencias. Escuela profesional de Ingeniería Física, Lima, Perú].
- Conley, R. T. (1979). Espectroscopia infrarroja. Editorial Alhambra S.A., 2° edición, 1979, Madrid, España.

- Dawson, B. (1923). The structure of the 9(18)-heteropoly anion in potassium 9(18)-tungstophosphate,  $K_6(P_2W_{18}O_{62}) \cdot 14H_2O$ . *Acta Crystallogr.* 6, 113.
- Domínguez Capitaine, B. P.; Cerecedo Núñez, H. H.; Padilla Sosa, P.; García Ramírez, J. I. (2020). La interacción de la luz con moléculas. *Revista Digital Universitaria*, 21, 5.
- Espectroscopía de Emisión Atómica ICP-OES. (2019). Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.
- Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C. (2018). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 4ta Ed. Springer.
- Granados Cristancho, Y. A. (2015). Importancia De Los Ensayos TGA y DSC en el Estudio de las Propiedades Térmicas de Mezclas Asfálticas [Tesis de grado, Universidad Distrital Francisco José De Caldas, Bogotá D.C., Colombia].
- Harvey, D. (2016). Química Analítica 2.1. LibreTexts Espanol. [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Química\\_Analítica/Química\\_Analítica\\_2.1\\_\(Harvey\)/10%3A\\_Métodos\\_espectroscópicos/10.07%3A\\_Espectroscopia\\_de\\_Emisió\\_n\\_Atómica](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Química_Analítica/Química_Analítica_2.1_(Harvey)/10%3A_Métodos_espectroscópicos/10.07%3A_Espectroscopia_de_Emisió_n_Atómica). Disponible el 22 de enero de 2024.
- Jiménez Heinert, M. E.; Grijalva Endara, A. M.; Ponce Solórzano, H. X. (2020). Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *Recimundo* 4, 4-12.
- Kang, K. W.; Echarri, J. M.; Llorente, C. L. (2013). Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis. Segundas Jornadas de Investigación y Transferencia. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Kang, K. W. (2020). Curso de postgrado “Arcillas, zeolitas y materiales mesoporosos ordenados como adsorbentes selectivos. Preparación, caracterización y aplicaciones tecnológicas”. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Levine M. (2021). ICP-OES: química de ICP, análisis de ICP-OES, fortalezas y limitaciones. Análisis y separaciones. <https://www.news-courier.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265>

- Matkovic, S. R.; Valle, G. M.; Gambaro, L. A.; Briand, L. E. (2008). Environmentally friendly synthesis of Wells–Dawson heteropolyacids Active acid sites investigation through TPSR of isopropanol. *Catal. Today* 133-135, 192-199.
- Matkovic, S. R. (2009). Desarrollo de la Síntesis Catalítica de Ibuprofeno: Investigación de la Aplicabilidad del Heteropoliácido Fosfotúngstico de Wells Dawson como Catalizador en la Reacción de Acilación Eco-Compatible de Isobutilbenceno [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina].
- Matkovic, S. R.; Collins, S. E.; Bonivardi, A. L.; Bañares, M. A.; Briand, L. E. (2015). Molecular structure and thermal stability of oxide-supported phosphotungstic Wells-Dawson heteropolyacid *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 8097-8105.
- Matkovic, S. R.; Bosco, M.; Collins, S. E.; Briand, L. E. (2019). Tailored Brønsted and Lewis surface acid sites of phosphotungstic Wells Dawson heteropoly-acid. *Appl. Surf. Sci.* 495, 143565.
- <sup>b</sup>Matkovic, S. R.; Bosco, M.; Collins, S. E.; Briand, L. E. (2019). Investigación de sitios ácidos del heteropoliácido de Wells-Dawson por adsorción de piridina. *An. Asoc. Quím. Argent.* 106 (1), 1-7.
- Mbomekalle, I-M.; Lu, Y-W.; Keita, B.; Nadjo, L. (2004). Simple, high yield and reagent-saving synthesis of pure  $\alpha$ -K<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub> · 14H<sub>2</sub>O. *Inorg. Chem. Commun.* 7, 86-90.
- Montoro, S. S. (2019). Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido. Escuela Argentina de Catálisis 2019. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.
- Rodríguez, E.; Villegas, E. (2012). Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y materiales*, 2.
- Sambeth, J. E.; Baronetti, G. T.; Thomas, H. J. (2003). A theoretical–experimental study of Wells–Dawson acid: An explanation of their catalytic activity. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 191, 35-43.

Sherman Hsu, C-P. (1997). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry infrared spectroscopy. F. Settle (Ed.), Prentice-Hall, Inc., 247–283, Upper Saddle River, New Jersey.

Parry, E. P. (1963). An infrared study of pyridine adsorbed on acidic solids. Characterization of surface acidity. *J. Catal.* 2, 371- 379.

Pila, M. N. (2020). Remediación de aguas contaminadas con plaguicidas mediante adsorción sobre partículas de sílice funcionalizadas y materiales carbonosos [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina].

Tamura, M.; Shimizu, K.; Satsuma, A. (2012). Comprehensive IR study on acid/base properties of metal oxides. *Appl. Catal. A: Gen.* 433-434, 135-145.

Toledo, M. V. (2015). Resolución cinética enzimática eco-compatible de R/S-Ketoprofeno [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina].

# CAPÍTULO 4

METODOLOGÍAS UTILIZADAS  
EN LAS REACCIONES DE  
ESTERIFICACIÓN Y  
TRANSESTERIFICACIÓN Y EN EL  
ANÁLISIS CUALI Y  
CUANTITATIVO DE LOS  
REACTIVOS Y PRODUCTOS

En este capítulo se describen las metodologías a través de las cuales se realizaron las reacciones de esterificación de ácido oleico y transesterificación de aceite vegetal con alcoholes. Asimismo, se presentan los fundamentos de las técnicas utilizadas para la identificación y cuantificación de reactivos y productos; siendo las mismas la cromatografía gaseosa, la espectroscopia infrarroja, la determinación del índice acidez y la cuantificación de glicerol por métodos químicos.

## 4.1 ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO

### 4.1.1 Reacciones de esterificación con heteropolicompuestos

Se investigó la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol utilizando el ácido fosfotúngstico con estructura de Wells-Dawson  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5H_2O$  (HPA). Así mismo se estudió la reacción utilizando las sales de manganeso ( $Mn_{3,4}P_2W_{18}O_{62} \cdot 31H_2O$ ) y de níquel ( $Ni_{4,6}P_2W_{18}O_{62} \cdot 2,7H_2O$ ) con estructura de Wells-Dawson que fueron sintetizadas previamente por nuestro grupo de investigación (Matkovic et al., 2019).

Las reacciones se realizaron a 85°C y 150 rpm con 200,0 mg de catalizador. Se pesaron 20,00 g de ácido oleico y se colocaron en un reactor discontinuo tipo batch, constituido por un balón un balón de 3 bocas provisto de un refrigerante, calefaccionado en un baño de glicerina con agitación magnética. A fin de evitar pérdidas por evaporación se colocó un globo de látex en el extremo del refrigerante. El procedimiento experimental consistió en llevar al sistema con el ácido oleico a la temperatura deseada, luego agregar el catalizador y el metanol absoluto bajo agitación magnética. Las relaciones molares ácido oleico:metanol utilizadas fueron: 1:1, 1:3 y 1:7 (corresponden a 2,80; 8,40 y 20,0 mL de metanol, respectivamente) y se realizaron a distintos tiempos de reacción, 1, 3 y 24 horas. Adicionalmente, se estudió la esterificación usando 8,6 mg de HPA a 85°C, 150 rpm, con una relación molar ácido oleico: metanol 1:7 y 3 horas de reacción.

La conversión obtenida en las reacciones de esterificación fue calculada a partir de la concentración de ácidos grasos libres determinados mediante el índice de acidez (ver Sección 4.4). Una vez calculada la conversión fue determinada la actividad específica como se detalla en la Sección 4.7.

#### 4.1.2 Reacciones de esterificación con heteropoliácido soportado

Se investigó la actividad del HPA disperso sobre dióxido de titanio anatasa en proporciones de 4% p/p, el cual está formado por 4 g de HPA cada 100 g de catalizador soportado, y 42% p/p que corresponden a 1 y 15 mg/m<sup>2</sup> de heteropoliácido, respectivamente. Estos materiales se denominaron 4% HPA/TiO<sub>2</sub> y 42% HPA/TiO<sub>2</sub>.

Se utilizó un sistema de reacción como el descrito en la Sección 4.1.1 realizando todos los experimentos con 20,00 g de ácido oleico. Se investigó la actividad del 4% HPA/TiO<sub>2</sub> usando 200 mg del catalizador, el cual contiene 8,6 mg de HPA, una relación molar ácido oleico: metanol 1:7 a 85°C y 150 rpm durante 3 horas. Se llevó a cabo la reacción en las mismas condiciones, pero usando 24,0 mg del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub>, el cual contiene 9,5 mg de HPA. Al comparar la actividad de ambos materiales se continuaron los estudios utilizando el catalizador con 42% del heteropoliácido.

En la investigación de estos materiales catalíticos se estudió el efecto de la temperatura en la reacción a 60, 65, 70 y 85°C, masas de catalizador de 16; 24; 32 y 48,9 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub>, los cuales contienen entre 6,8 y 20,2 mg de HPA, velocidades de agitación de 150, 350 y 650 rpm y tiempos de reacción de 1 y 3 horas. Asimismo, se estudió la relación molar ácido oleico: metanol estequiométrica (1:1) y con 2 y 6 moles de metanol en exceso (relaciones molares 1:3 y 1:7, respectivamente).

En todos los casos, se ensayaron las reacciones en iguales condiciones, pero sin catalizador (reacción blanco), las cuales se tomaron en consideración al calcular la actividad específica, restando los moles convertidos en las reacciones sin catalizador.

El exhaustivo estudio de las variables de operación descritas anteriormente y su posterior análisis a través de algoritmos no-lineales permitieron obtener las condiciones óptimas para alcanzar la mayor conversión de ácido oleico. Estas condiciones de operación optimizadas a través de una reacción test sencilla, se replicaron en la transesterificación de aceite usado en cocción como se discutirá más adelante.

## 4.2 TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE VEGETAL FRESCO Y USADO EN COCCIÓN

### 4.2.1 Estudio de la reacción de transesterificación de aceite de girasol usado en cocción catalizada con el ácido fosfotúngstico de estructura Wells Dawson

Se investigó la actividad catalítica del ácido fosfotúngstico de Wells-Dawson disperso sobre  $\text{TiO}_2$  de 42% HPA/ $\text{TiO}_2$  en la transesterificación de aceite de girasol usado con metanol.

A fin de poseer un sistema reproducible y controlado, en una primera etapa, se sometió a un aceite de girasol comercial (Marca Caracas) a cinco ciclos de cocción de alimentos a la temperatura de  $170^\circ\text{C}$  durante 20 min. Este procedimiento permitió obtener un aceite vegetal usado con índice de acidez igual a 1, similar a los aceites descartados por locales gastronómicos.

Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo en un reactor como el descrito en la Sección 4.1.1. En el mismo se colocaron 20,00 g de aceite usado, el sistema se llevó a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  y se trabajó con agitación de 650 rpm. Se investigaron relaciones molares aceite: metanol iguales a 1:7, 1:9 y 1:12 (6,20; 8,00 y 10,60 mL de alcohol agregado, respectivamente) usando 24 mg de catalizador 42% HPA/ $\text{TiO}_2$  a 3, 6 y 24 horas de reacción. Asimismo, se investigó el efecto en el aumento en la cantidad de catalizador duplicando la masa del mismo a 49,6 mg usando una relación molar 1:9 y 3 horas de reacción.

Para estudiar el reuso del catalizador 42% HPA/ $\text{TiO}_2$ , se centrifugó el medio de reacción proveniente de la transesterificación de aceite usado en cocción con una relación molar 1:9, en la que se usó 49,6 mg de catalizador a  $60^\circ\text{C}$  y 650 rpm durante 3 horas. Luego de centrifugar, se separó el catalizador y se usó en una nueva reacción en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió para un nuevo ciclo de reacción.

En todos los casos, se realizó el blanco de reacción que consta en realizar un sistema con iguales condiciones, pero sin agregado de catalizador, con este valor se determina si hay transesterificación sin presencia de catalizador y se elimina su impacto en los cálculos de conversión.

Para las reacciones con aceite los resultados se obtuvieron por análisis cromatográfico. Los reactivos y productos, de cada uno de los sistemas se analizaron por

cromatografía gaseosa según se describirá en la Sección 4.5.4. En esa sección se detallarán las ecuaciones utilizadas para calcular la conversión, el rendimiento a metil ésteres de ácidos grasos, y las selectividades a glicerol; mono y diglicéridos. Adicionalmente, se determinó el índice de acidez del medio de reacción, como se describe en la Sección 4.4. A partir de estos datos fue calculada la actividad específica como muestra la Sección 4.7.

#### **4.2.2 Reacciones de transesterificación de aceite usado catalizadas con el biocatalizador comercial Eversa® Transform**

A fin de investigar las condiciones óptimas en la transesterificación de aceite usado en cocción utilizando el catalizador comercial Eversa® Transform en un principio se comenzó realizando ensayos con aceite de girasol fresco.

Los ensayos se realizaron en un sistema de reacción tipo batch, como el descrito en la Sección 4.1.1, con una masa de 100,00 g de aceite y 2,00 mL de agua destilada agregada al medio de reacción. Las investigaciones involucraron el estudio del efecto de la cantidad de biocatalizador entre 1% y 2% v/p como porcentaje de volumen de biocatalizador respecto de la masa de aceite. Asimismo, se estudiaron la influencia de la cantidad de alcohol en la reacción usando relaciones molares aceite: metanol 1:4,5; 1:6,8 y 1:8,9, las cuales corresponden a 20,00; 30,00 y 40,00 mL de metanol. El alcohol se agregó en 4 alícuotas al inicio de la reacción, a los 60 min, 3 y 5 horas para evitar una alta concentración de metanol que podría afectar la estructura de la enzima. Las reacciones se realizaron a 35°C, con agitación magnética a 650 rpm durante 24 horas.

Una vez determinadas las condiciones óptimas correspondientes a la relación aceite: alcohol y la masa de biocatalizador al utilizar aceite de girasol fresco, se continuó la investigación realizando estudios con aceite usado en cocción. Los estudios se llevaron a cabo utilizando una relación molar aceite: alcohol 1:6,8 y 1% v/p del biocatalizador Eversa® Transform. Se realizó la reacción con 100,00 g de aceite usado, 1,00 mL de biocatalizador, a 35°C, 650 rpm durante 24 horas de reacción con y sin agua agregada, y se investigó si la transesterificación era llevada a cabo con distintos alcoholes lineales de cadena corta absolutos como metanol (Cicarelli, 99,8%), etanol (Biopack, 99,5%), 1-propanol (Sigma-Aldrich, 99,5%) y 1-butanol (Sigma-Aldrich, 99,4%).

En todos los casos, se realizaron los blancos de reacción llevando a cabo las reacciones en iguales condiciones, pero sin catalizador.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de reuso del catalizador, para lo cual se centrifugaron los medios de reacción de las transesterificaciones de aceite usado con los cuatro alcoholes ensayados y agua agregada y se separaron las fases para utilizar la fase inferior (acuosa), la cual contiene a la enzima. Posteriormente, en un balón se agregaron 100,0 g de aceite usado y al llegar a la temperatura de 35°C se adicionó la fase acuosa conteniendo la enzima. Luego se agregó el alcohol en alícuotas y se dejó reaccionar durante 24 horas.

#### **4.2.3 Estudio de la actividad catalítica de la lipasa presente en el látex de la planta *Araujia sericifera* en la reacción de transesterificación de aceite usado en cocción**

Se investigó la actividad catalítica en la reacción de transesterificación de aceite de girasol de la lipasa contenida en el látex de la planta *Araujia sericifera* (ASL). Esta lipasa tiene la propiedad de encontrarse auto-soportada en el látex.

El estudio se realizó sobre muestras de aceite sin usar y aceite usado en cocción. En ambos casos se pesaron 100,0 g de aceite y se utilizaron 0,05 g de látex con la lipasa ASL. El sistema se llevó a una temperatura de 45°C, la misma corresponde a la temperatura óptima de la actividad enzimática y con agitación de 650 rpm. Se estudió la reacción luego de agregar 20,0 mL de metanol absoluto y en otros casos se utilizó la misma cantidad, pero usando como reactivo etanol absoluto. Las relaciones molares correspondientes de aceite: alcohol fueron 1:4,5 y 1:3, respectivamente. En cada caso, el alcohol correspondiente se agregó en alícuotas de 5,0 mL que fueron agregadas a intervalos de 1, 3 y 5 horas de reacción. La reacción se realizó durante 24 horas, luego de lo cual se elevó la temperatura a 100°C para desnaturalizar la enzima y detener la reacción.

En todos los casos, se realizaron los blancos de reacción donde se ensayaron las reacciones en iguales condiciones, pero sin catalizador.

En el caso de las reacciones con ASL, además del análisis por cromatografía gaseosa e índice de acidez, se estudió el contenido de glicerol libre en los medios de reacción mediante un método volumétrico descrito en la Sección 4.6.1.

#### **4.2.4 Estudio de la actividad catalítica de la lipasa presente en el látex de la planta *Araujia sericifera* en las reacciones secuenciales de hidrólisis y posterior esterificación de aceite usado en cocción utilizando diferentes alcoholes**

En virtud de la capacidad hidrolítica de las lipasas, se investigó la hidrólisis del aceite vegetal y la posterior esterificación de los ácidos grasos con alcoholes como una alternativa a la reacción directa de transesterificación.

##### **4.2.4.1 Actividad catalítica de la lipasa ASL en la hidrólisis de aceite usado en cocción**

Se realizaron los estudios para establecer las condiciones óptimas de la reacción de hidrólisis del aceite usado de girasol con ASL. A tal fin se investigó el efecto de la cantidad de enzima, de agua agregada, tiempo y temperatura de reacción, como así también el agregado de un co-solvente. Los ensayos se realizaron con aceite de girasol usado de marca comercial Caracas. El mismo fue recuperado de una freidora de tipo industrial agua-aceite perteneciente a un comedor universitario y había sido usado durante una semana en la cocción de alimentos con diferente contenido acuoso.

Los experimentos fueron llevados a cabo con 10,0 g de aceite usado colocado en frascos contenidos en un shaker y estos ensayos involucraron la variación de la masa de biocatalizador usando 2,5; 5,0 y 7,5 mg; distintas temperaturas de reacción, 25, 30, 45 y 60°C y la adición de agua destilada al medio de reacción en volúmenes variables de 2,5; 5,0 y 7,5 mL. En todos los casos, las reacciones fueron llevadas a cabo a 200 rpm y se tomaron muestras del medio de reacción a distintos tiempos entre 0 y 72 horas.

Dado que el sistema estudiado es heterogéneo, se investigó el efecto del agregado de un co-solvente orgánico en la reacción de hidrólisis del aceite vegetal. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis de aceite usado en las condiciones óptimas usando 10,0 g (11 mmoles) de aceite usado en cocción con 5,0 mL de agua agregada, correspondiente a una relación molar aceite: agua 1:25, y 0,0050 g de ASL, por lo cual se estaría trabajando con un 0,05% p/p de biocatalizador en el medio de reacción, y se agregó 1,0 mL de n-heptano. Las condiciones de este experimento fueron 25°C y 200 rpm durante 30 minutos. Asimismo, se realizó la hidrólisis de aceite usado en cocción con la lipasa ASL en presencia de n-heptano en las condiciones reportadas por Sánchez y colaboradores

(Sánchez et al., 2019). Para este ensayo, se utilizaron 0,9000 g (1 mmol) de aceite usado, con la adición de agua destilada en una relación molar aceite: agua 1:9; 1,0 mL de n-heptano y 0,0900 g de ASL que corresponde a un 10% p/p de biocatalizador en el medio de reacción. Este sistema se llevó a 30°C a 200 rpm durante 5 horas.

Una vez transcurrido los 30 minutos de reacción se procedió a separar la fase oleosa de la acuosa por medio de una centrifugación. Posteriormente, se realizó el análisis de la fase oleosa por varios métodos, tales como espectroscopia infrarroja FTIR, cromatografía gaseosa y se determinó el índice de acidez con el fin de cuantificar los ácidos grasos libres generados durante la hidrólisis y determinar la conversión de los glicéridos. A partir de estos fue calculada la actividad enzimática específica como se describe en la Sección 4.7.

Mediante los estudios realizados se encontraron las condiciones operativas óptimas para la hidrólisis biocatalizada del aceite vegetal.

#### **4.2.4.2 Estudio de la reutilización de la lipasa ASL en la hidrólisis**

A fin de estudiar el reuso del biocatalizador en la hidrólisis de aceite usado en cocción, se realizó un ensayo para determinar en qué fase se encuentra suspendida la lipasa en el medio de reacción. Este estudio se realizó preparando un sistema con 10,0 g de aceite usado en cocción, 5,00 mL de agua y 5,0 mg de ASL, se eliminó la fase acuosa sustituyéndose por una nueva alícuota de agua y se llevó a 25°C, 200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó el medio de reacción para separar las fases y se determinó el índice de acidez de la fase oleosa.

En un segundo ensayo para la reutilización, luego de la hidrólisis del aceite usado en cocción en las condiciones óptimas, se centrifugó y separó la fase acuosa y se reutilizó para hidrolizar 10,0 g de aceite usado. Estos ensayos se realizaron en las condiciones óptimas encontradas para la hidrólisis y luego se determinó el índice de acidez de la fase oleosa. Este procedimiento se repitió para un tercer ciclo de reacción.

#### **4.2.4.3 Esterificación de los ácidos grasos libres generados a partir de la hidrólisis del aceite**

En una segunda etapa de este estudio, se investigaron reacciones de esterificación de los ácidos grasos libres generados en la hidrólisis de aceite usado en las condiciones óptimas vistas en la Sección 4.2.4.1. Específicamente se estudió la reacción con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, usando una relación molar 1:0,2 de aceite usado: alcohol, la cual corresponde a la cantidad necesaria con un 15% en exceso respecto de la cantidad estequiométrica para esterificar los ácidos grasos generados en la hidrólisis. Asimismo, se ensayaron relaciones molares 1:3 y 1:6 de aceite: alcohol. En todos los casos, se llevaron a cabo a 25°C y 200 rpm y se realizó un seguimiento de las reacciones durante 1, 3, 6, 8 y 10 horas.

Por otro lado, se estudió el efecto de la remoción de la fase acuosa luego de la hidrólisis en la esterificación de los ácidos grasos. En este sentido, se realizaron reacciones de hidrólisis en las condiciones óptimas y los medios de reacción fueron centrifugados para separar las fases. Luego de separarlas, se utilizó la fase oleosa para la esterificación con metanol y etanol usando las relaciones molares aceite: alcohol 1:0,2; 1:3 y 1:6, durante 3 horas a 25°C y 200 rpm.

#### **4.2.5 Investigación de la reacción de transesterificación en dos etapas utilizando una combinación de los biocatalizadores ASL y comercial Eversa® Transform**

Según se discutirá en el Capítulo 6, la transesterificación del aceite catalizada con el biocatalizador comercial Eversa® Transform presenta un rendimiento elevado a ésteres de ácidos grasos entre el 73 y el 95%. Sin embargo, el medio al final de la reacción posee un índice de acidez alto lo que evidencia la presencia de ácidos grasos libres. Por su parte, la lipasa vegetal autóctona ASL posee la capacidad de transesterificar, así como también hidrolizar los triglicéridos y de esterificar los ácidos grasos libres en etapas como se presentará en el Capítulo 7.

En vista de estos resultados se investigó la combinación de dos procedimientos consecutivos en los cuales se utilizaron ambos biocatalizadores con el objetivo de

incrementar el rendimiento a ésteres de ácidos grasos y disminuir o eliminar la presencia de ácidos grasos libres en el producto de la reacción.

En este contexto, se investigaron: (1) la hidrólisis del aceite con la lipasa ASL y la posterior esterificación y transesterificación con Eversa® Transform; y (2) la transesterificación con Eversa® Transform, seguida de la hidro-esterificación con ASL.

En el primer caso, se realizó la hidrólisis con ASL en las condiciones óptimas descritas en la sección 4.2.4.1. Luego, se centrifugó para separar las fases acuosa y oleosa. De esta manera se separa la enzima y en la fase oleosa quedan los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis, los mono-, di- y triglicéridos remanentes. Esta fase oleosa se utilizó para realizar la reacción con el biocatalizador comercial y los alcoholes de diferente cadena carbonada en las condiciones operativas óptimas para cada uno de ellos que se presentarán en el Capítulo 7.

En la segunda estrategia, se realizó la transesterificación del aceite usado con Eversa® Transform y al finalizar la reacción se centrifugó el medio de reacción a fin de separar la enzima, se tomó la fase oleosa, para proceder a la reacción de hidro-esterificación de los ácidos grasos y glicéridos remanentes en presencia de la ASL. Las condiciones de reacción sobre la fase oleosa recuperada fueron: 50% v/p de agua destilada, 0,05% p/p de la lipasa ASL, luego el sistema se llevó a 25°C en un shaker con una agitación de 200 rpm durante 30 minutos seguido del agregado de alcohol para realizarla esterificación durante 10 h. En estos ensayos se utilizaron volúmenes de alcohol que corresponden a un exceso de 30% en moles respecto de la cantidad requerida para esterificar los ácidos grasos libres y los glicéridos presentes luego de la reacción con el biocatalizador comercial, siendo los mismos 2,30; 4,60; 1,75 y 11,30 mL de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, respectivamente.

El aceite usado y las fases oleosas de los medios de reacción fueron analizados mediante cromatografía gaseosa. Así mismo, se determinó el índice de acidez. Ambos análisis permitieron cuantificar los glicéridos y ácidos grasos libres y de esta manera poder determinar los esteres obtenidos. Las ecuaciones utilizadas para calcular la conversión, rendimiento, selectividad y actividad de los catalizadores, se presentan en las secciones 4.5.4 y 4.7.

### 4.3 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Previamente, en la sección 3.3.1 se presentaron los fundamentos de la espectroscopia infrarroja. En esta sección se discute la metodología del análisis espectroscópico de las fases oleosa y acuosa de los medios de reacción de hidrólisis con la lipasa nativa ASL.

El análisis espectroscópico de la fase oleosa se realizó a partir de soluciones al 1% v/v en  $\text{CCl}_4$  (Dorwil 99,9%). Se utilizó una celda específica para el análisis espectroscópico de líquidos por transmisión que consta de ventanas de fluoruro de calcio  $\text{CaF}_2$  y longitud de paso variable. El análisis de la fase acuosa se realizó colocando una gota del líquido entre dos ventanas de  $\text{CaF}_2$  en una celda sellada a tal fin.

Los espectros FTIR se realizaron en el modo de absorción en un equipo Bruker Vertex 70, en el rango de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  con 60 escaneos. En particular, se estudiaron las señales de los glicéridos que se encuentran a  $3676$ ,  $3619$  y  $1746 \text{ cm}^{-1}$  y aquellas de los ácidos grasos ubicadas en  $3533$  y  $1709 \text{ cm}^{-1}$ .

Asimismo, se realizó la deconvolución y determinación de las áreas de las señales, lo que permitió un análisis semicuantitativo. En este sentido, se realizó la segunda derivada de las señales infrarrojas, se determinaron las cantidad y número de onda de los componentes de las mismas, y luego, se ajustaron con picos de forma Lorentziana utilizando un módulo del programa Origin 5.0.

### 4.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ

El índice de acidez se determinó con el fin de calcular la cantidad de ácidos grasos libres presentes tanto en el aceite fresco y usado en cocción, como en los productos de las diversas reacciones que se realizaron en este trabajo y fue determinado usando la normativa europea EN 14104. Este índice pone de manifiesto la masa en mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 g de muestra, lo cual permite calcular la cantidad de ácidos libres antes y después de la reacción.

En el caso de los medios de reacción, la mezcla de reacción se centrifugó para separar la fase acuosa de la fase oleosa que puede contener ácidos grasos libres. Se tomó 1,0 g de fase oleosa y se disolvió en 10,0 mL de una mezcla de etanol-tolueno (1:1)

previamente neutralizada. La misma se tituló con una solución etanólica de KOH 0,1 N usando fenolftaleína como indicador. El índice de acidez (IA) fue calculado usando la ecuación 4.1:

$$IA = \frac{M_{KOH} V_{KOH} C_{KOH}}{m_{muestra}} \quad (4.1)$$

Donde,  $M_{KOH}$  es el peso molecular del hidróxido de potasio;  $V_{KOH}$  es el volumen del KOH usado en la titulación en mL;  $C_{KOH}$  es la concentración molar del KOH en mol.L<sup>-1</sup> y  $m_{muestra}$  es la masa de la muestra usada en el análisis en g.

Para las reacciones de esterificación de ácido oleico es posible calcular la conversión a partir del índice de acidez del ácido oleico y del medio de reacción, como se muestra en la ecuación 4.2:

$$\text{conversión (\%)} = \frac{IA_{inicial} - IA_{final}}{IA_{inicial}} 100 \quad (4.2)$$

Donde  $IA_{inicial}$  y  $IA_{final}$  corresponden al índice de acidez antes y después de la reacción de esterificación, respectivamente.

## 4.5 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

### 4.5.1 Fundamento

La cromatografía gaseosa es una técnica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables, así como también su posterior detección (Abelló Linde S.A, s.f.). La muestra se desplaza con una fase móvil (gas) a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se encuentra fijada a una columna. Las fases son elegidas de manera que los componentes de la mezcla interactúen de forma diferente y haya una diferencia en la retención de estos en la fase estacionaria. La distinta movilidad entre los componentes permite la separación en bandas que pueden identificarse cualitativamente y analizarse cuantitativamente.

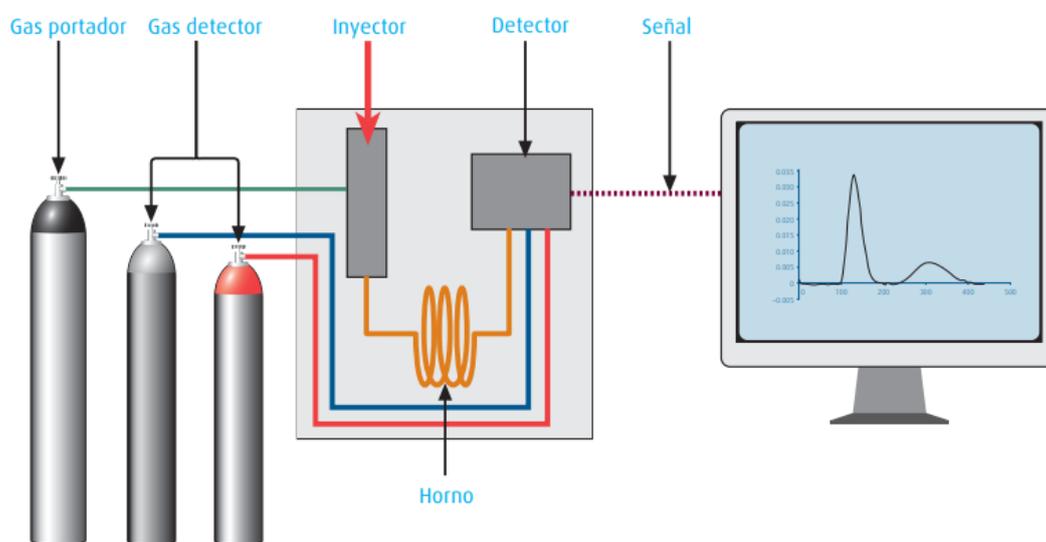
En cromatografía de gases (CG), la muestra se inyecta y se volatiliza en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, cuya única función es la del transporte de la muestra a través de la columna.

Durante el desplazamiento de la muestra a través de la columna se produce la separación de los componentes de la mezcla, los cuales son determinados gracias a un detector que amplifica la señal y la integra para obtener un análisis cuantitativo.

Existen principalmente dos tipos de cromatografía de gases:

- Cromatografía Gas-Sólido (CGS), cuya fase estacionaria es un sólido y el tipo de equilibrio con la fase móvil es una adsorción.

- Cromatografía Gas-Líquido (CGL) cuya fase estacionaria es un líquido adsorbido sobre un sólido, se rige por la distribución selectiva del analito entre la fase estacionaria y la móvil, el equilibrio está determinado por el coeficiente de reparto.



ELEMENTOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

**Figura 4.1.** Esquema representativo del equipo utilizado para la cromatografía gaseosa

(Abelló Linde S.A., s.f.).

En la Figura 4.1 se muestran los elementos básicos de la cromatografía gaseosa, a saber:

- El gas portador, cuya función es la de transportar la muestra a través de la fase estacionaria. Este debe ser químicamente inerte frente a los analitos estudiados y a la fase estacionaria de la columna. Los gases más usados son helio, nitrógeno e hidrógeno y la elección de este está dada por el tipo de detector, la eficiencia de la separación y su velocidad. El hidrógeno proporciona alta movilidad debido a su baja viscosidad y esto

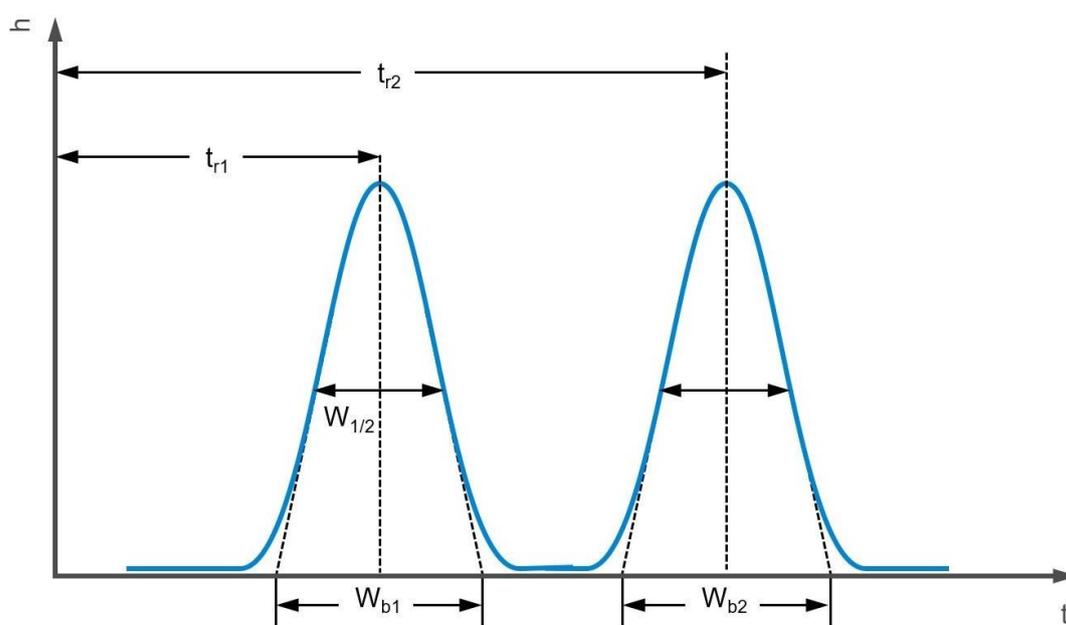
genera tiempos de análisis cortos. Sin embargo, el helio es el más usado ya que proporciona mejores resoluciones. Al elegir el gas portador hay que tener en cuenta su pureza, ya que la presencia de impurezas como hidrocarburos originan ruido en la línea de base disminuyendo la sensibilidad y los límites de detección de la separación. Por otro lado, la presencia de trazas de agua y oxígeno pueden descomponer la fase estacionaria. Para un correcto uso de gases en el equipo deben utilizarse materiales como reguladores de presión, caudalímetros y manómetros.

- El sistema de inyección de muestras consta de un septum, a través del cual se inyecta con una microjeringa la muestra líquida o gaseosa, y la cámara de vaporización instantánea ubicada en la cabeza de la columna la que permite vaporizar los líquidos ingresados.

- El horno donde se encuentra la columna. Los tipos de columnas que podemos encontrar son de dos tipos la empacitada y la capilar. Las mismas, pueden ser de vidrio, acero inoxidable, sílice o teflón y tienen entre 2 y 50 metros de longitud. La columna se encuentra en un horno que permite controlar la temperatura. La temperatura óptima a la que debe encontrarse la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido, la reducción de la temperatura conlleva a un aumento en el tiempo de elución.

- Detectores. Un detector ideal debe tener una buena sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad, una respuesta lineal, alta fiabilidad, amplio intervalo de temperatura de trabajo, tiempo de respuesta corto, no ser destructivo y tener un manejo sencillo. Actualmente no hay un detector que cumpla con todas esas características y su elección depende del componente a analizar. Los más comúnmente usados son: Detector de Ionización de Llama (FID), Detector de Conductividad Térmica (TCD), Detector de Captura Electrónica (ECD), Detector de Emisión Atómica (AED), Detector de Nitrógeno/Fósforo (NPD), Detector de Quimioluminiscencia del Azufre, Detector Termiónico (TID), Detector Fotométrico de Llama (FPD), Detector de Fotoionización (PID), entre otros. En general, los detectores necesitan de gases auxiliares de alta pureza para su buen funcionamiento; el FID, NPD y FPD necesitan una mezcla de aire sintético e hidrógeno para crear la llama, el ECD emplea una mezcla de metano en argón o nitrógeno y el TCD funciona con los gases portadores del sistema.

Al respecto del análisis cromatográfico, los parámetros más importantes a considerar son: el tiempo de retención de un compuesto ( $t_{Ri}$ ), el tiempo muerto ( $t_0$  o  $t_M$ ), el ancho de la señal en la línea de base ( $W_{bi}$ ), el ancho de la señal a la mitad de la altura ( $W_{1/2}$ ), el factor de retención ( $k'$ ), la selectividad ( $\alpha$ ), la eficiencia ( $N$ ), la altura equivalente ( $H$ ) y la resolución ( $R_s$ ) (ver Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Parámetros claves de la cromatografía gaseosa. Tiempos de retención ( $t_r$ ), ancho de base ( $W_b$ ) y ancho de la señal a la mitad de la altura ( $W_{1/2}$ ) (Agilent Technologies Inc., 2016).

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima, este depende de la interacción del compuesto con la fase estacionaria, de su polaridad, de la temperatura y longitud de la columna, del caudal y tipo de gas portador, entre otros. El tiempo muerto es el tiempo que tarda en atravesar la columna una especie química que no queda retenida en la misma.

El factor de retención (o factor de capacidad) es la relación entre los tiempos que un soluto pasa en las fases estacionaria y móvil. Se calcula a partir del cociente entre el tiempo de retención corregido ( $t_{Ri}-t_M$ ) y el tiempo muerto. La selectividad es una medida del tiempo o la distancia entre dos picos y se calcula como el cociente entre sus factores de retención.

La información acerca de la eficiencia (N) de una columna se expresa mediante el número de platos teóricos los cuales reflejan el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. Una columna con un valor N alto será más eficiente que una con un valor N más bajo, ya que generará señales más estrechas para un determinado tiempo de retención. Los parámetros que influyen sobre la eficiencia de la columna son su longitud (a mayor longitud, mayor eficiencia) y el tamaño de partícula (a menor tamaño de partícula, mayor eficiencia). Por otro lado, la altura equivalente a un plato teórico es otra medida de la eficiencia de la columna. Cuanto menor sea cada plato teórico, mayor será el número de platos por metro y la columna tendrá una mayor eficiencia.

La resolución indica la capacidad de una columna para separar los picos de interés. Esta depende de la eficiencia, la selectividad, la retención y debe tener como mínimo un valor igual a la unidad para lograr una separación suficiente que permita una adecuada cuantificación (Agilent Technologies Inc., 2016).

#### **4.5.2 Análisis del aceite y de los productos de reacción mediante cromatografía gaseosa**

Se realizaron análisis por cromatografía gaseosa, a fin de llevar a cabo un estudio cualitativo y cuantitativo del aceite de girasol, así como también de los productos de las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación. El análisis cromatográfico permite cuantificar los glicéridos presentes, así como también pueden observarse las señales correspondientes a ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos.

En esta investigación se empleó un equipo GC-2010 Plus Tracera equipado con un detector de ionización por ruptura de barrera dieléctrica (BID). El análisis de los reactivos y productos se realizó de acuerdo a las normas EN 14105 y ASTM D6584, y se cuantificaron mediante el método de standard interno. Se utilizó una columna capilar MEGA-Biodiesel 105 (15 m x 0.32 mm x 0.1  $\mu$ m) desarrollada específicamente para el análisis de triglicéridos a altas temperaturas.

En la Tabla 4.1 se presentan las condiciones de operación del equipo (Navas et al., 2018).

**Tabla 4.1.** Condiciones de operación para el análisis cromatográfico

<b>Inyección</b>	Temperatura del inyector	350°C
	Inyección	Split
	Split	100
	Volumen de muestra	1 µl
<b>Gas portador</b>	Naturaleza	Helio
	Caudal	3 mL/min
	Presión	500 psi aprox.
<b>Programa de temperatura</b>	Temperatura inicial	50°C
	Rampa n°1	15 °C/min
	Temperatura final n°1	180°C
	Rampa n°2	7°C/min
	Temperatura final n°2	230°C
	Rampa n°3	30°C/min
	Temperatura final n°3	350°C
	Tiempo total de análisis	30 min
<b>Detección</b>	Temperatura del detector	350°C
	Naturaleza del gas	Helio

El pretratamiento de las muestras se realizó de acuerdo con las normas mencionadas previamente (EN 14105 y ASTM D6584). Se empleó tricaprina como standard interno para los distintos tipos de glicéridos, y N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) como derivatizante. La reacción de derivatización involucra una sililación, en la cual se reemplazan los hidrógenos ácidos de los grupos hidroxilos de los mono-, di- y triglicéridos por grupos trimetilsilil(-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) provistos por el agente derivatizante (Neves Días et al., 2012; Prados et al., 2012). Para ello, se colocaron 100,0 mg de muestra en un vial, se le adicionaron 100 µl de standard interno y 100 µl de derivatizante, se agitó vigorosamente durante 20 minutos, y finalmente se adicionaron 8,00 mL de n-heptano. Luego se tomó 1 µl de la muestra preparada y se analizó por cromatografía gaseosa. Una vez obtenidos los cromatogramas, se procedió a la asignación de las señales correspondientes a mono-,

di- y triglicéridos, así como también a la identificación de las señales pertenecientes a los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos.

#### **4.5.3 Asignación de las señales del análisis cromatográfico de glicéridos, ácidos grasos y ésteres**

A fin de llevar a cabo el estudio cuantitativo de los glicéridos iniciales y finales del medio de reacción fue esencial determinar la forma de asignación de las señales obtenidas en los cromatogramas del aceite fresco comercial y del usado en cocción, así como también de las muestras obtenidas luego de realizar las reacciones estudiadas. Mediante el uso de la cromatografía gaseosa se determinaron los moles de mono-, di y triglicéridos presentes y, a partir de este análisis, se calcularon los moles de glicerol formados por un método indirecto, como se presenta en la Sección 4.6.2. La cuantificación de los glicéridos permitió determinar la conversión de los mismos, el rendimiento a ésteres de ácidos grasos, la selectividad y la actividad de los catalizadores en las distintas condiciones investigadas.

En esta Tesis los análisis por cromatografía gaseosa se realizaron de acuerdo con la norma ASTM D6584 que es ampliamente usada para el análisis de biodiesel. Sin embargo, el análisis de los productos de la transesterificación enzimática con lipasas merece especial atención debido a la formación de cantidades importantes de monoglicéridos. Como veremos en los capítulos 6 y 7, la transesterificación con lipasas conduce a la formación de glicerol, diglicéridos y en gran medida a monoglicéridos. Teniendo en cuenta que los tiempos de retención de los monoglicéridos son similares a los de los ésteres y los ácidos grasos libres, las señales generadas por los mismos dan lugar a la cuantificación errónea del biodiesel producido. Por lo tanto, el análisis del biocombustible generado por catálisis enzimática requiere de un estudio más meticuloso de las señales obtenidas en el cromatograma que el del biodiesel producido mediante la transesterificación de aceite con catalizadores ácidos o básicos. Además, en la catálisis enzimática por cada mol de triglicéridos convertidos a monoglicéridos se producen 2 moles de ésteres (o ácidos grasos libres) en lugar de 3 como ocurre en la reacción convencional de obtención de biodiesel donde la conversión es de triglicéridos a glicerol y los ésteres correspondientes en general FAME.

A fin de realizar una inequívoca asignación de las señales, se procedió a comparar la información bibliográfica y la obtenida experimentalmente del análisis de biodiesel obtenido de forma convencional, aceite de girasol fresco y usado. Se utilizó la información obtenida de los cromatogramas correspondientes a los análisis de los medios de reacción luego de la transesterificación con metanol.

Por otro lado, se determinó el índice de acidez de las muestras, datos que contribuyeron en el estudio y la asignación de las señales cromatográficas correspondientes a los ácidos grasos libres.

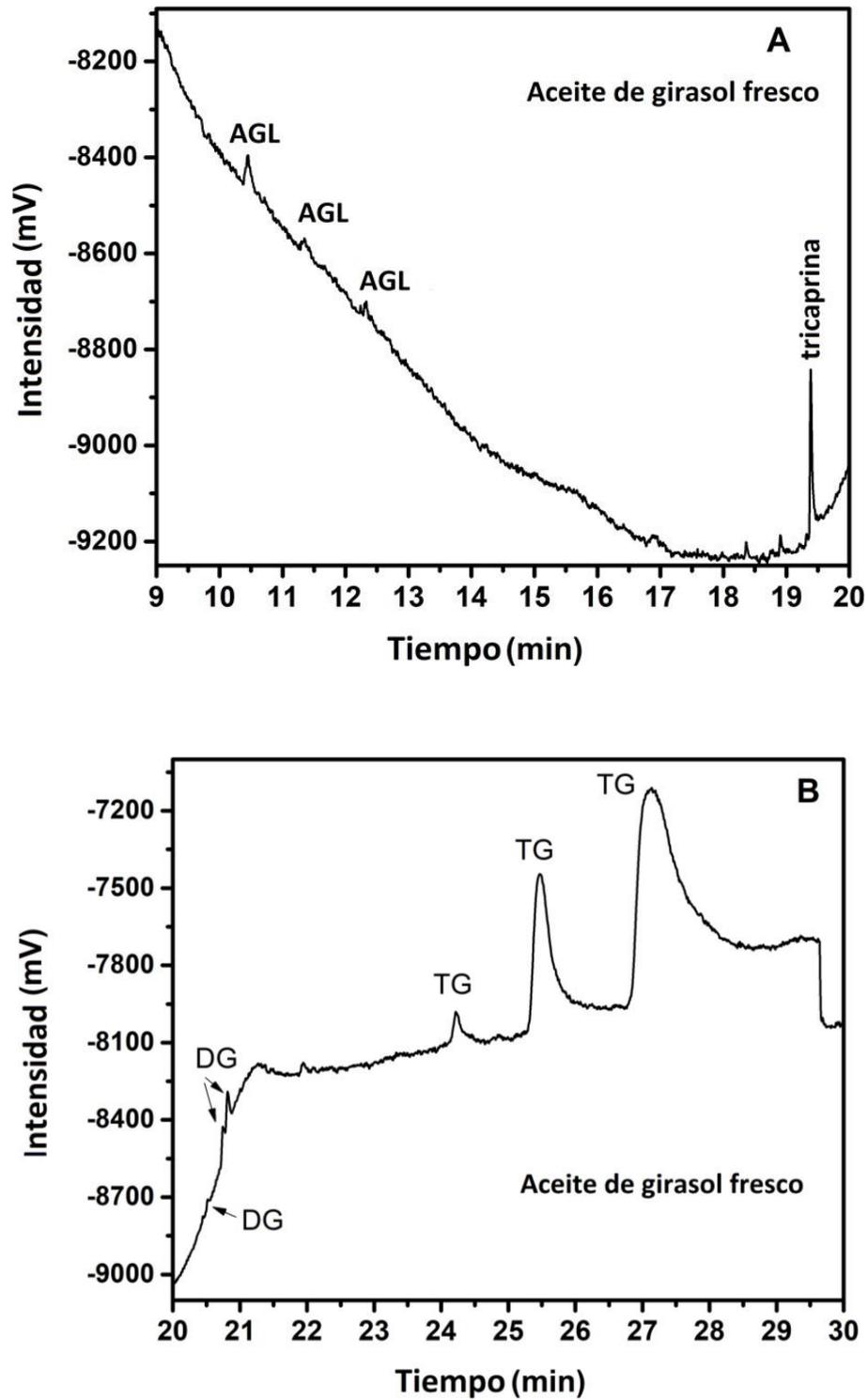
La búsqueda bibliográfica al respecto del análisis por cromatografía gaseosa de ácidos grasos libres y de ésteres de ácidos grasos, dio como resultado que la información publicada al respecto era escasa. Sin embargo, entre los artículos encontrados, puede destacarse un estudio realizado por Kail que mostró que los ácidos grasos libres y ésteres tienen tiempos de retención similares (Kail et al., 2012). Por otro lado, Pauls reportó una investigación sobre el análisis cromatográfico de una gran variedad de ésteres metílicos de ácidos grasos donde se indica que los tiempos de retención de esos ésteres se encuentran entre los 9 y los 12 minutos (Pauls, 2011). Adicionalmente, posteriores contribuciones establecieron que los tiempos de retención de los ésteres de ácidos grasos aparecen entre los del glicerol y los monoglicéridos (Sanek et al., 2013). Esta información permitió completar los estudios cromatográficos realizados. Los cromatogramas que se presentan en las Figuras 4.3 y 4.4 corresponden a una muestra de aceite de girasol fresco y una de aceite de girasol usado en cocción. En ambos se muestran las señales obtenidas para los distintos tiempos de análisis, en el cromatograma A el tiempo de análisis se encuentra entre 9 y 20 min y en el cromatograma B entre 20 y 30 min. Al comparar los cromatogramas de las Figuras 4.3 y 4.4, se observa claramente que las señales ubicadas en 10 min, 10,8 min y 11,2 min son más intensas en el aceite usado que en el fresco lo cual nos lleva a la hipótesis de que las mismas corresponderían a ácidos grasos libres. Por otra parte, la determinación del índice de acidez indica la formación de ácidos grasos libres, ya que el índice de acidez aumenta luego de la cocción. Con lo cual se concluye que las señales se deben a ácidos grasos libres ya que es conocido que durante la cocción se hidrolizan parte de los triglicéridos. La observación del aumento de las señales

cromatográficas indicadas, sumado al mayor índice de acidez permite atribuir las mismas a los ácidos grasos libres.

Asimismo, las señales en 13,3 min, 14 min, 15,7 min, 17,4 min y 18,9 min que se observan en el cromatograma A del aceite usado (Figura 4.4) pueden atribuirse a los monoglicéridos generados por la hidrólisis durante la cocción; esta conclusión se ve reforzada por los estudios reportados al respecto, (Pauls, 2011; Alleman et al., 2019; Planck & Hall, 1995; Ruppel & Loorbeer, 2006; Satou et al., 2017; Mc Curry, 2012; Paryanto et al., 2019; Neves Dias et al., 2014; Neves Dias et al., 2012). Con respecto a la señal que se observa en ambas figuras a los 19,4 minutos pertenece a la tricaprina que fue el estándar utilizado.

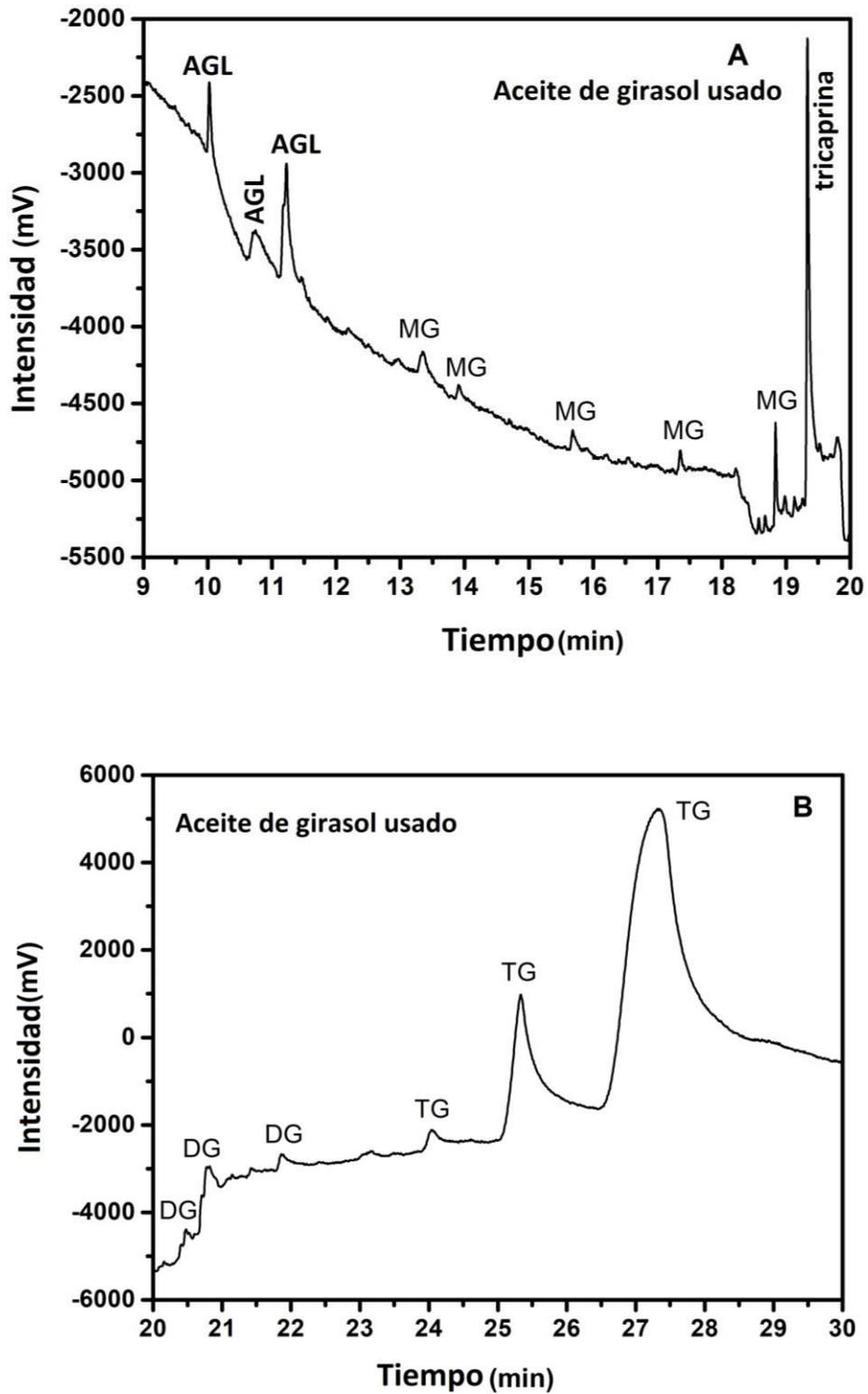
En los cromatogramas B donde se muestran las señales entre 20 y 30 min tanto en la Figuras 4.3 como 4.4 se presentan a los 20,5 min, 20,8 min y 21,9 min señales correspondientes a los diglicéridos (Mc Curry, 2012; Ruppel & Loorbeer, 2006; Pauls, 2011; Planck & Hall, 1995; Satou et al., 2017). Puede observarse que estas señales son más intensas en el aceite usado como consecuencia de la hidrólisis.

Las señales correspondientes a los triglicéridos se encuentran a los 24 min, 25,4 min y 27 min (Okullo et al., 2013; Qian et al., 2020; Planck & Hall, 1995). Tanto en el aceite fresco como en el usado, sus áreas superan ampliamente a las áreas de los glicéridos restantes debido a que son el componente principal de los aceites.



**Figura 4.3.** Señales obtenidas del análisis por cromatografía gaseosa del aceite de girasol fresco entre los 9 y 20 minutos de tiempo de retención (A) y los 20 y 30 min (B).

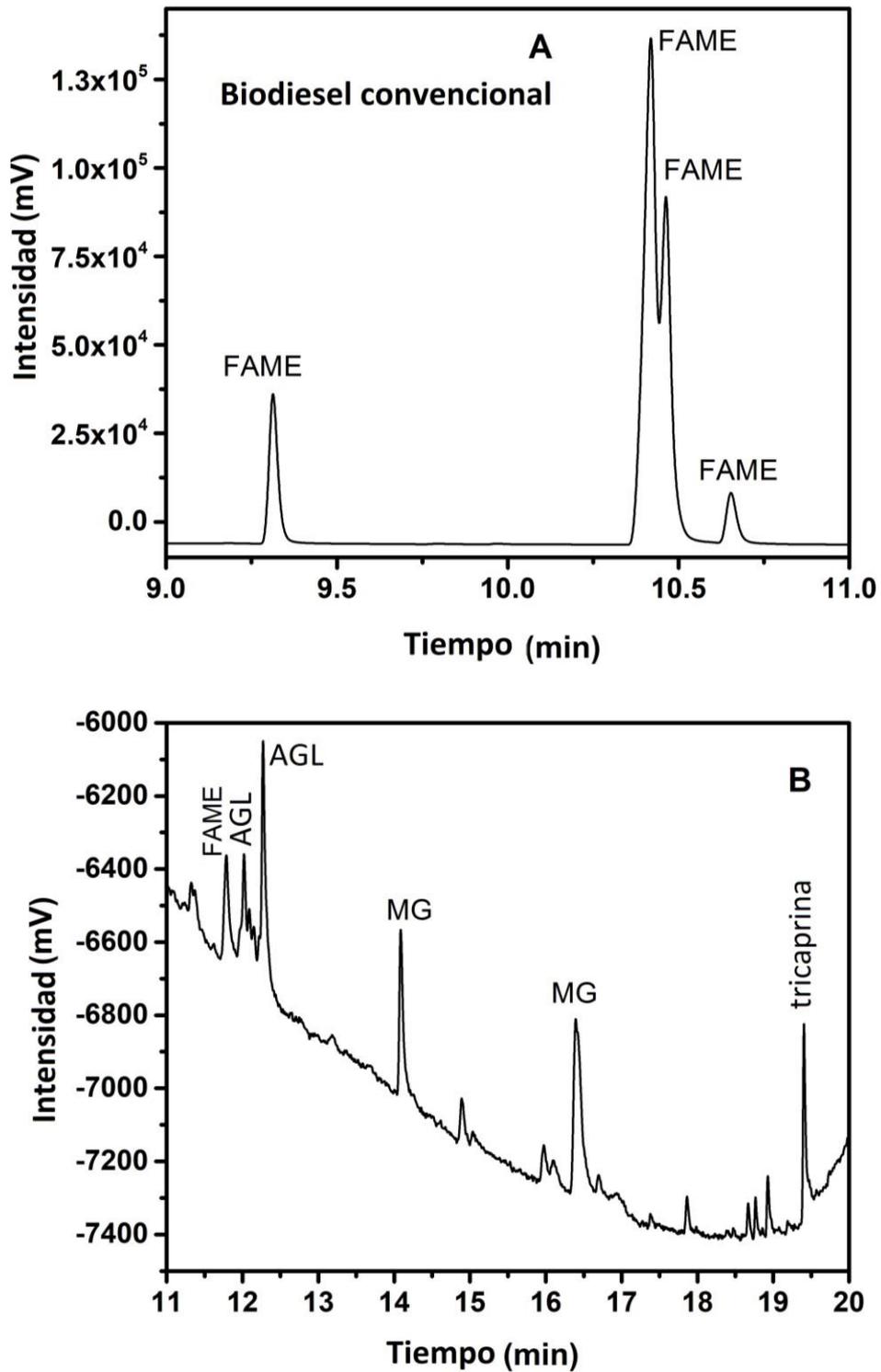
AGL, ácidos grasos libres; DG, diglicéridos; TG, triglicéridos



**Figura 4.4.** Señales obtenidas del análisis por cromatografía gaseosa del aceite de girasol usado entre 9 y 20 min de tiempo de retención (A) y los 20 y 30 min (B). AGL, ácidos grasos libres; MG, monoglicéridos; DG, diglicéridos; TG, triglicéridos

Asimismo, se llevó a cabo la identificación de las señales que se encuentran en los cromatogramas de los medios de reacción. Para ello, se analizó una muestra de biodiesel producido mediante el método convencional, donde la reacción fue entre el aceite vegetal con NaOH en metanol, y se comparó con el medio de reacción generado luego de la transesterificación de aceite usado catalizada por vía enzimática, cuya reacción fue investigada durante esta Tesis. Las Figuras 4.5 y 4.6 muestran las señales del análisis cromatográfico del biodiesel obtenido con el método convencional y del biodiesel obtenido por catálisis enzimática donde el cromatograma A muestra el intervalo entre los 9 y 11 min y el cromatograma B el intervalo comprendido entre los 11 y 20 min.

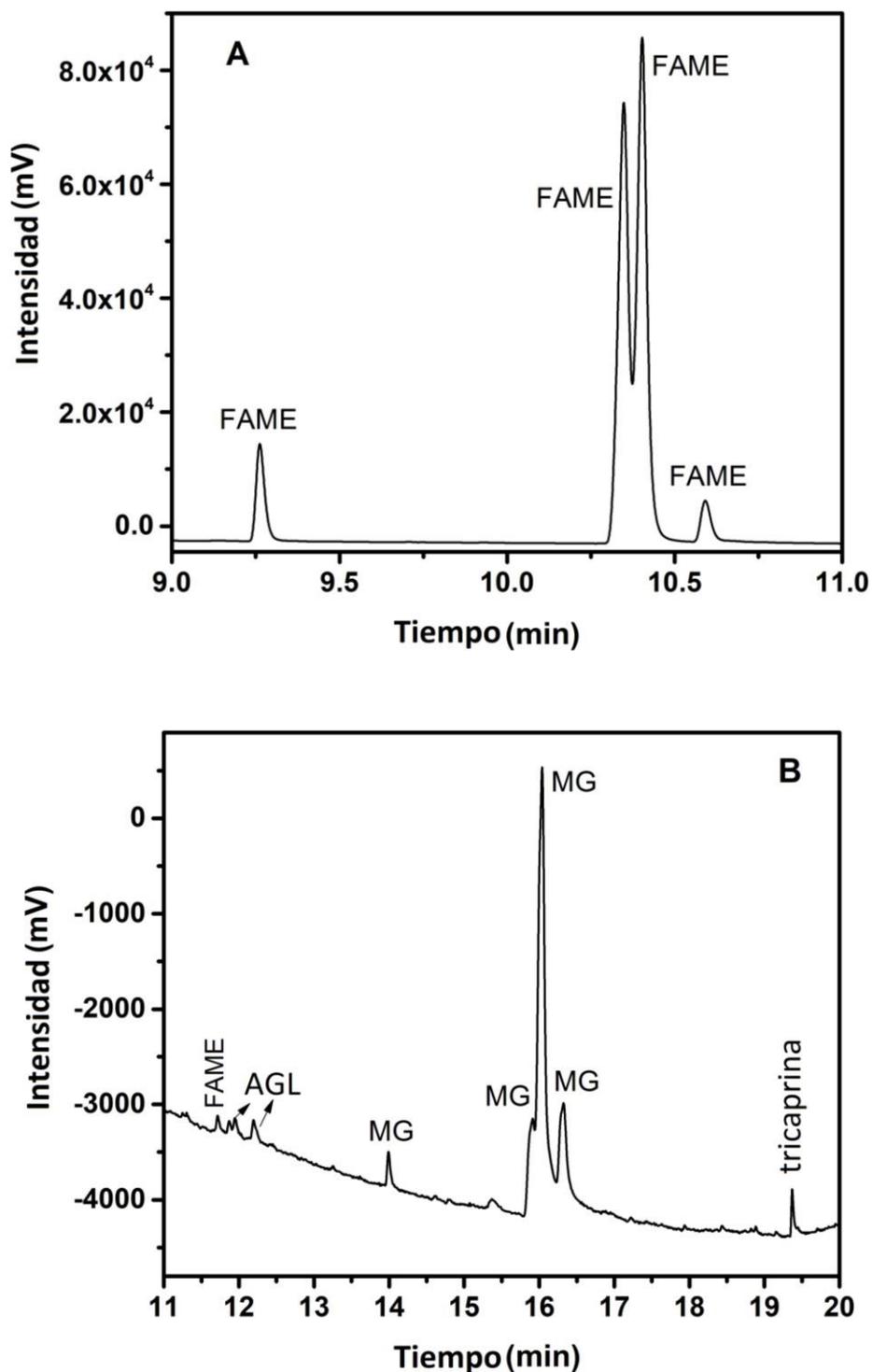
Estas muestras presentaron señales entre los 9 y 12 minutos que podrían corresponder a los ácidos grasos libres o bien a los ésteres de estos. La identificación de estas señales se realizó en base a las referencias bibliográficas y a los resultados obtenidos en los cromatogramas del aceite fresco y usado, y biodiesel (Pauls, 2011). Adicionalmente, se puede observar que las señales de los monoglicéridos son más intensas en el caso del biodiesel generado mediante transesterificación enzimática (ver Figuras 4.5 B y 4.6 B).



**Figura 4.5.** Señales obtenidas del análisis por cromatografía gaseosa de una muestra de biodiesel producido mediante el método convencional entre los 9 y 11 min de tiempo de retención (A) y los 11 y 20 min (B).

AGL, ácidos grasos libres; DG, diglicéridos; TG, triglicéridos;

FAME, ésteres metílicos de ácidos grasos



**Figura 4.6.** Señales obtenidas del análisis por cromatografía gaseosa del medio de reacción de la transesterificación por vía enzimática de aceite de girasol entre los 9 y 11 min de tiempo de retención (A) y los 11 y 20 min (B).

AGL, ácidos grasos libres; DG, diglicéridos; TG, triglicéridos;

FAME, ésteres metílicos de ácidos grasos

En las Tablas 4.2 y 4.3 se presenta la asignación de las señales características de los análisis cromatográficos del aceite de girasol fresco y usado, del biodiesel producido mediante el método convencional y del medio de reacción luego de la transesterificación de aceite fresco y usado con un catalizador enzimático. En la última columna se detalla los trabajos previos que, junto con el índice de acidez determinado y los cromatogramas obtenidos, permitieron identificar cada señal.

**Tabla 4.2.** Asignación de las señales de glicerol, ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos libres presentes en el análisis cromatográfico del aceite de girasol fresco y usado, en biodiesel generado por el método convencional y por vía enzimática mediante la transesterificación de aceite fresco y usado. AG, ácidos grasos; AGL, ácidos grasos libres.

Sustancias	Aceite		Biodiesel convencional	Transesterificación enzimática de aceite		Bibliografía
	Fresco	Usado		Fresco	Usado	
Glicerol				4,55	4,50	Pauls,2011; Mc Curry, 2012; Planck,1995; Ruppel, 2006
Ésteres de AG			9,18	9,26	9,21	Pauls, 2011
AGL	10,08	10,02			10,02	
Ésteres de AG			10,42	10,35	10,27	Pauls, 2011
			10,46	10,40	10,32	
			10,65	10,59	10,53	
AGL		10,74				
					11,17	
	11,31	11,22			11,22	
	11,56					
Ésteres de AG			11,79	11,72		Pauls, 2011
AGL	12,02		12,02	11,95		
	12,25		12,27	12,19		

**Tabla 4.3.** Asignación de las señales de los glicéridos presentes en el análisis cromatográfico del aceite de girasol fresco y usado, en biodiesel generado por el método convencional y en los medios de reacción luego de la transesterificación por vía enzimática.

Sustancias	Aceite		Biodiesel convencional	Transesterificación enzimática de aceite		Bibliografía
	Fresco	Usado		Fresco	Usado	
<b>Monoglicéridos</b>		13,34			13,35	Pauls, 2011; Alleman, 2019
		13,90	14,09	13,99	13,90	Pauls, 2011; Planck, 1995; Ruppel, 2006; Satou, 2017
		15,68				Pauls, 2011; Planck, 1995; Ruppel, 2006
				15,91	15,92	Pauls, 2011; Planck, 1995; Ruppel, 2006
				16,04	16,21	Pauls, 2011; Mc Curry, 2012; Ruppel, 2006
			16,39	16,32		Alleman, 2019; Mc Curry, 2012; Paryanto, 2019
		17,36				Dias, 2014
		18,84				Neves Diaz, 2012
<b>Tricaprina</b>	19,37	19,33	19,34	19,37	19,33	Estándar interno
<b>Diglicéridos</b>	20,43	20,47		20,43	20,40	Mc Curry, 2012; Ruppel, 2006
	20,73			20,73	20,70	Mc Curry, 2012
	20,80	20,82		20,85		
		21,86			21,86	Pauls, 2011; Planck, 1995; Satou, 2017
<b>Triglicéridos</b>	24,16	24,04			24,02	Okullo, 2013; Qian, 2020
	25,44	25,33		25,37	25,31	Qian, 2020
	27,04	27,31		26,92	27,17	Planck, 1995; Qian, 2020

#### 4.5.4 Cuantificación de glicéridos

Una vez asignadas las señales correspondientes a los mono-, di- y triglicéridos, se llevó a cabo la cuantificación de los mismos. Para ello, se integraron las áreas correspondientes a cada uno de ellos y a partir de los moles de estándar utilizados, y teniendo en cuenta los factores de respuesta de mono-, di- y triglicéridos en cromatografía gaseosa, se calcularon los moles de glicéridos presentes en cada muestra. Al comparar esta información con la cuantificación de ácidos grasos libres obtenido mediante la determinación del índice de acidez se calculó la cantidad de ésteres de ácidos grasos producidos durante las reacciones, así como también la selectividad hacia la formación de diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Las ecuaciones 4.3, 4.4 y 4.5 muestran la forma en la que se calcularon los moles de triglicéridos convertidos, moles de monoglicéridos y diglicéridos producidos, respectivamente.

$$\text{Moles TG convertidos} = \text{moles TG iniciales} - \text{moles TG finales} \quad (4.3)$$

$$\text{Moles MG producidos} = \text{moles MG finales} - \text{moles MG iniciales} \quad (4.4)$$

$$\text{Moles DG producidos} = \text{moles DG finales} - \text{moles DG iniciales} \quad (4.5)$$

La conversión de glicéridos fue determinada mediante la ecuación 4.6:

$$\text{Conversión de glicéridos (\%)} = \frac{(\text{TG} + \text{DG} + \text{MG})_{\text{convertidos}}}{(\text{TG} + \text{DG} + \text{MG})_{\text{iniciales}}} 100 \quad (4.6)$$

Los moles de ácidos grasos libres (denominados AGL) son calculados a partir de los índices de acidez, según la ecuación 4.7:

$$\text{Moles AGL} = \frac{\text{IA } m_{\text{muestra}} V_{\text{m}}}{1000 M_{\text{KOH}} V_{\text{final}}} \quad (4.7)$$

Donde IA es el índice de acidez de la muestra,  $m_{\text{muestra}}$  es la masa y  $V_{\text{final}}$  el volumen de la solución preparada para cromatografía gaseosa.  $V_{\text{m}}$  es el volumen de solución inyectado en el cromatógrafo y  $M_{\text{KOH}}$  el peso molecular del KOH. Esta ecuación fue

elaborada no solo con el objetivo de cuantificar los moles de ácidos grasos libres presentes, sino que también puedan ser comparados con los glicéridos presentes, por esta razón se incluyeron los datos correspondientes a la solución preparada para analizar las muestras por cromatografía gaseosa como se explica a continuación.

El glicerol (GLI) producido fue calculado como la diferencia entre los triglicéridos convertidos, los mono- y diglicéridos producidos, como se muestra en la ecuación 4.8.

$$\text{Moles GLI} = \text{moles TG convertidos} - \text{moles (MG + DG) producidos} \quad (4.8)$$

A partir de los moles de ácidos grasos libres calculados mediante los índices de acidez, se determinaron los ácidos grasos libres convertidos a ésteres, los cuales surgen de la diferencia entre los moles de ácidos libres iniciales y finales (ver ecuación 4.9).

$$\text{Moles AGL convertidos} = \text{moles AGL iniciales} - \text{moles AGL finales} \quad (4.9)$$

Para calcular el rendimiento de cada reacción se determinó la cantidad de ésteres de ácidos grasos producidos, teniendo en consideración cuantos provienen de la formación de cada glicérido. Por lo tanto, los moles de ésteres se calcularon como la suma de tres veces la cantidad de glicerol formado, dos veces la cantidad de monoglicéridos producidos, una vez la cantidad de diglicéridos producidos y la cantidad de ácidos grasos libres AGL convertidos, como se puede ver en la ecuación 4.10.

$$\text{Moles ésteres} = 3. \text{ moles GLI producido} + 2. \text{ moles MG producidos} + \text{ moles DG producidos} + \text{ moles AG libres convertidos} \quad (4.10)$$

A partir de los moles de ésteres de ácidos grasos formados, y considerando la cantidad máxima que podría formarse, se calculó el rendimiento (ecuación 4.11). Esta ecuación incluye el número de moles totales que podrían formarse durante la reacción, los cuales son 3 moles provenientes de cada mol de triglicéridos, 2 moles procedentes de diglicéridos, un mol formado a partir de monoglicéridos y uno de ácidos grasos libres.

$$\text{Rendimiento a ésteres} = \frac{\text{moles de ésteres formados}}{(3.\text{moles TG}+2.\text{ moles DG}+\text{moles MG}+\text{moles AGL})\text{iniciales}} 100 \quad (4.11)$$

Asimismo, la selectividad a glicerol, mono- y diglicéridos se calculó de acuerdo a las ecuaciones 4.12, 4.13 y 4.14.

$$\text{Selectividad a GLI (\%)} = \frac{\text{moles de GLI formados}}{\text{moles de glicéridos convertidos}} 100 \quad (4.12)$$

$$\text{Selectividad a MG (\%)} = \frac{\text{moles de MG formados}}{\text{moles de glicéridos convertidos}} 100 \quad (4.13)$$

$$\text{Selectividad a DG (\%)} = \frac{\text{moles de DG formados}}{\text{moles de glicéridos convertidos}} 100 \quad (4.14)$$

## 4.6 ANÁLISIS DE GLICEROL LIBRE

Con el objetivo de cuantificar el glicerol presente al finalizar la reacción, se llevó a cabo la medida de glicerol libre mediante un método volumétrico reportado previamente por Pisarello y colaboradores (Pisarello et al., 2010). Este método muestra ser adecuado en determinaciones de glicerol al realizar reacciones de transesterificación con catalizadores de naturaleza inorgánica. Sin embargo, en esta Tesis al estudiar reacciones biocatalizadas, las determinaciones de glicerol se realizaron de forma indirecta a partir de los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa ya que el método volumétrico no resulta adecuado para medir el glicerol proveniente de reacciones llevadas a cabo por catálisis enzimática. Esto se debe a que estas reacciones generan una alta selectividad a monoglicéridos y estos interfieren en esta técnica de cuantificación.

### 4.6.1 Método analítico volumétrico

En principio se realizó una puesta a punto del método reportado por Pisarello a fin de adaptarlo a las condiciones de reacción utilizadas (Francisco & Matkovic, 2015). Se procedió a los análisis para determinar el porcentaje de glicerol libre en el aceite de girasol fresco y usado, así como, en los medios resultantes luego de la reacción. A tal

fin, se realizó un procedimiento de extracción de glicerina, si la misma estuviera presente, en 8,00 g de muestra mediante dos lavados con 6,00 mL de HCl 5% p/v a 65 °C durante 15 min y 350 rpm y un tercer lavado con 1,50 mL de agua en las mismas condiciones. Las fases acuosas obtenidas luego de los tres lavados se utilizaron en conjunto para cuantificar glicerol.

A las mismas, de acuerdo al método, se les añadió rojo de fenol como indicador y se le agregó NaOH 2N hasta que la solución viró a color fucsia. Posteriormente se le agregó una solución de HCl 5 %p/v hasta color amarillo y se hirvió por 3 minutos. Al enfriarse, se le agregó NaOH 0,1 N hasta color fucsia, con el fin de neutralizar la solución. Luego, se le añadieron 15 mL de una solución 0,28 M de NaIO<sub>4</sub> preparada en el momento con agua hervida. Se dejó 5 minutos en la oscuridad y se le agregaron 2,0 mL de etilenglicol, se dejó nuevamente en la oscuridad durante 5 minutos y se tituló con una solución de NaOH 0,1 N. Para calcular el porcentaje de glicerol presente se utilizó la ecuación (4.15):

$$\% \text{ GL} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot 0,0921 \cdot N_{\text{NaOH}}}{m_{\text{muestra}}} \cdot 100 \quad (4.15)$$

#### 4.6.2 Cálculo indirecto de glicerol mediante datos obtenidos del análisis cromatográfico

Como vimos en la Sección 4.5.4, mediante el análisis por cromatografía gaseosa es posible calcular la cantidad de glicéridos convertidos o producidos luego de una reacción química. Por lo tanto, con el análisis del aceite y de los productos de reacción es posible cuantificar el glicerol formado a partir del cálculo de la diferencia entre la cantidad de triglicéridos convertidos y los mono- y diglicéridos producidos, como se mostró en la ecuación 4.8.

#### 4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS CATALIZADORES

La actividad específica corresponde al cociente de los micromoles convertidos en función de la masa de catalizador (en miligramos) y el tiempo de reacción (en horas), según se observa en la ecuación 4.16:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{micromoles convertidos}}{\text{masa catalizador (mg) tiempo(h)}} \quad (4.16)$$

En las reacciones de esterificación de ácido oleico, los micromoles convertidos corresponden a los de ácido oleico convertidos a oleato de metilo, calculados a partir de la ecuación 4.2. En el caso de las reacciones con aceite se consideraron los glicéridos convertidos mediante las ecuaciones presentadas en la Sección 4.5.4.

En todos los casos, se tuvieron en cuenta solo los micromoles convertidos en presencia del catalizador estudiado, restando los micromoles convertidos en la reacción blanco.

#### **4.8. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS A TRAVÉS DE ALGORITMOS NO-LINEALES: OBTENCIÓN DE SUPERFICIES DE RESPUESTA**

A fin de encontrar las condiciones de operación óptimas se trabajó en colaboración con la Dra. Claudia Ruscitti para desarrollar gráficos de superficies de respuesta mediante algoritmos no-lineales. Para ello, se utilizaron los datos experimentales obtenidos y se ajustaron mediante el Algoritmo de Levenberg-Marquardt (LMA) con el objetivo de analizar las condiciones más apropiadas para continuar con la investigación. El ajuste de los datos y los gráficos se realizaron utilizando el software Origin 2022b.

Se realizaron gráficos que evidencian el efecto de la actividad enzimática específica de la ASL en función de la cantidad de catalizador y de agua agregada, así como también su efecto en función de la cantidad de catalizador y la variación de la temperatura en las reacciones de hidrólisis. A partir de los mismos se encontraron las condiciones más adecuadas para la hidrólisis de aceite de girasol usado en cocción.

Por otro lado, se desarrollaron gráficos de superficie de respuesta para llevar a cabo el estudio de la esterificación de ácido oleico con metanol usando el catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub>. Los mismos mostraron la actividad específica que presenta el catalizador según la cantidad de catalizador y el exceso de metanol en la reacción y la dependencia de la actividad con la temperatura y velocidad de agitación. Adicionalmente, se graficó la cantidad de tungsteno lixiviado a distintas temperaturas y tiempos de reacción.

#### 4.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelló Linde, S.A., s.f. Cromatografía de Gases. Recuperado de:

[https://www.academia.edu/36689232/Cromatograf%C3%ADa\\_de\\_gases](https://www.academia.edu/36689232/Cromatograf%C3%ADa_de_gases)

Cromatografía de gases.

Agilent Technologies, Inc. (2016). Fundamentos de la cromatografía de gases: teoría.

Recuperado de:

[https://www.academia.edu/36689232/Cromatograf%C3%ADa\\_de\\_gases%20Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases](https://www.academia.edu/36689232/Cromatograf%C3%ADa_de_gases%20Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases)

Alleman, T. L.; Christensen, E. D.; Moser, B. R. (2019). Improving biodiesel monoglyceride determination by ASTM method D6584-17. *Fuel* 241, 65-70.

ASTM D6584: Standards Test Method for Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography.

EN 14105: Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, tri-glyceride content.

Francisco, N. & Matkovic, S. R. (2015). Puesta a punto y optimización de técnicas para la cuantificación de biodiesel producido a partir de aceites comestibles usados. Recuperado en marzo de 2024 de <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/65030>.

Kail, B. W.; Link, D. D.; Morreale, B. D. (2012). Determination of free fatty acids and triglycerides by gas chromatography using selective esterification reactions. *J. Chromatogr. Sci.* 50, 934–939.

Matkovic, S. R.; Bosco, M.; Collins, S.E.; Briand, L. E. (2019). Tailored Brønsted and Lewis surface acid sites of the phosphotungstic Wells Dawson heteropoly-acid. *Appl. Surf. Sci.* 495, 143565.

- Navas, M. B.; Lick, I. D.; Bolla, P. A.; Casella, M. L.; Ruggera, J. F. (2018). Transesterification of soybean and castor oil with methanol and butanol using heterogeneous basic catalysts to obtain biodiesel. *Chem. Eng. Sci.* 187, 444–454.
- Neves Dias, A.; Barnes Rodrigues Cerqueira, M.; Rodrigues de Moura, R.; Scherer Kurz, M.; Clementin, R.; Goncalves Montes D'Oca, M.; Primel, E. G. (2012). Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel* 94, 178-183.
- Neves Dias, A.; Scherer Kurz, M. H.; Maciel Fagundes, C. A.; Souza Caldas, S.; Clementin, R. M.; Gonçalves Montes D'Oca, M.; Primel, E. G. (2014). Evaluation of ASTM D6584 method for biodiesel ethyl esters from sunflower oil and soybean/tallow mixture and for biodiesel methyl esters from tung oil and soybean/tung mixture. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1161–1165.
- Mc Curry, J. D. (2012). Analysis of glycerin and glycerides in biodiesel (B100) using ASTM D6584 and EN14105. Application. Agilent Technologies Inc., 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808, USA.
- Monteiro, R. R. C.; Arana-Peña, S.; da Rocha, T. N.; Miranda, L. P.; Berenguer-Murcia, A.; Tardioli, P. W.; dos Santos, J. C. S.; Fernandez-Lafuente, R. (2021). Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renew. Energ.* 164, 1566–1587.
- Okullo, A.; Ogwok, P.; Temu, A. K.; Ntalikwa, J. W. (2013). Gas chromatographic determination of glycerol and triglycerides in biodiesel from jatropha and castor vegetable oils. *Adv. Mater. Res.* 824, 436–443.
- Paryanto, I.; Prakoso, T.; Suyono, E. A.; Gozan, M. (2019). Determination of the upper limit of monoglyceride content in biodiesel for B30 implementation based on the measurement of the precipitate in a biodiesel–petrodiesel fuel blend (BXX). *Fuel* 258, 116104.
- Pauls, R. E. (2011). A review of chromatographic characterization techniques for biodiesel and biodiesel blends. *J. Chromatogr. Sci.* 49, 384–396.

- Pisarello, M. L.; Dalla Costa, B. O.; Veizaga, N. S.; Querini, C. A. (2010). Volumetric Method for Free and Total Glycerin Determination in Biodiesel. *Ind. Eng. Res.* 49, 8935– 8941.
- Planck, C. & Lorbeer, E. (1995). Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 697, 461–468.
- Prados, C. P.; Rezende, D. R.; Batista, L. R.; Alves, M. I. R.; Antoniosi Filho, N. R. (2012). Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. *Fuel* 96, 476– 481.
- Qian, Y.; Rudzinska, M.; Grygier, A.; Przybylski, R. (2020). Determination of triacylglycerols by HTGC-FID as a sensitive tool for the identification of rapeseed and olive oil adulteration. *Molecules* 25, 3881.
- Ruppel, T. & Hall, G. (2006). Free and total glycerin in B100 biodiesel by gas chromatography. Field application report. Perkin Elmer life and analytical sciences. 710 Bridgeport Avenue, Shelton CT 06484, USA.
- Satou, C.; Goto, H.; Yamazaki, Y.; Saitou, K.; Matsumoto, S.; Takahashi, O.; Miyazaki, Y.; Ikuta, K.; Yajima, Y. (2017). Modified gas chromatographic method to determine monoacylglycerol and diacylglycerol contents in edible fats and oils. *J. Oleo Sci.* 66, 601–606.

# **CAPÍTULO 5**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL  
ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE  
TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE  
USADO UTILIZANDO  
COMO CATALIZADORES  
HETEROPOLICOMPUESTOS DE  
WELLS-DAWSON**

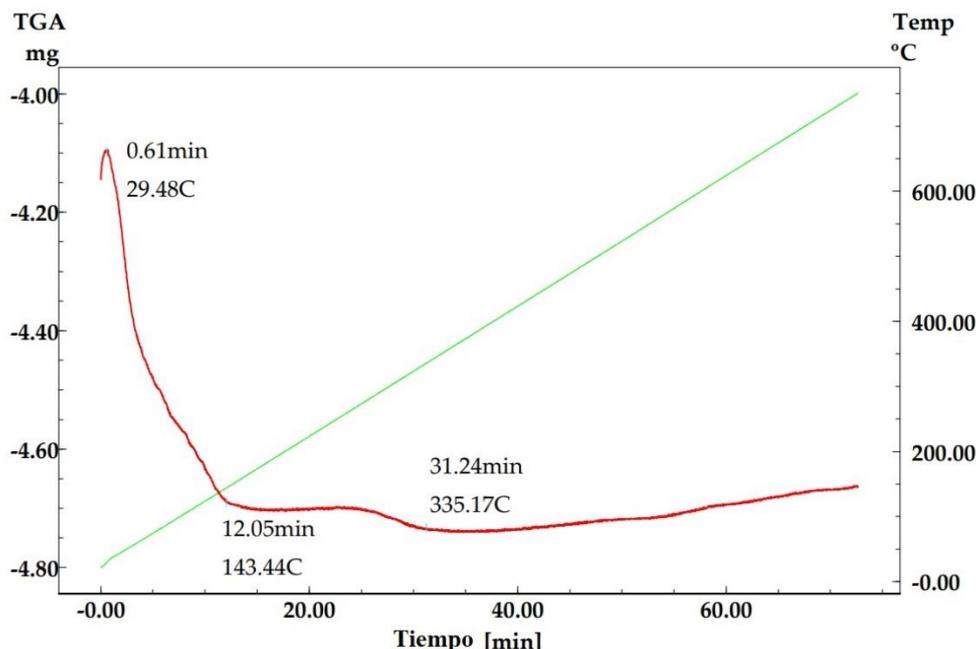
En este Capítulo se presentan los resultados y la discusión acerca de la investigación de la esterificación de ácido oleico con el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson másico y dispersado sobre dióxido de titanio, así como también la investigación de la actividad catalítica de sus sales de manganeso y níquel. La esterificación de este ácido graso suele proporcionar una estimación adecuada de la potencialidad para catalizar sustratos más complejos, como los aceites vegetales, motivo por el cual se utilizó como reacción test y para optimizar los parámetros de reacción. Asimismo, en este capítulo se presentan y discuten los resultados del estudio de la transesterificación de aceite usado en cocción utilizando el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson soportado y su posterior reutilización.

## **5.1 CARACTERIZACIÓN DE HETEROPOLICOMPUESTOS**

La determinación de la fórmula correcta y la caracterización de los diversos heteropolicompuestos que se presentarán a lo largo de este capítulo se realizó mediante el análisis termogravimétrico de los materiales, como así también por espectroscopia infrarroja, análisis elemental por medio de una microsonda de electrones y por microscopia electrónica de barrido. Los fundamentos y las metodologías utilizadas en cada uno de ellos, se encuentran descriptos en el capítulo 3 de esta Tesis y los resultados se presentan a lo largo de esta sección.

### **5.1.1. Análisis termogravimétrico: determinación de la fórmula molecular del HPA**

Los resultados del análisis termogravimétrico del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson másico (HPA) se pueden observar en la Figura 5.1. La curva roja indica la pérdida de masa del HPA en función del tiempo, mientras que la recta verde, cuyos valores corresponden al eje de ordenadas de la derecha, muestra el incremento de la temperatura en función del tiempo.



**Figura 5.1.** Análisis termogravimétrico desde 10°C a 750°C del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson másico. Pérdida de masa de la muestra (línea roja) y temperatura (línea verde) en función del tiempo.

El perfil termogravimétrico muestra una importante pérdida de masa entre 29,5°C y 143,4°C que se atribuye a la desorción de agua fisisorbida de acuerdo a las investigaciones reportadas por Sambeth y colaboradores. En el rango de temperatura que se extiende entre 143,4°C y los 335,2°C, se produce la pérdida de 2 moléculas de agua por unidad de heteropolianión (Sambeth et al., 2003; Matkovic et al., 2011; Matkovic et al., 2015).

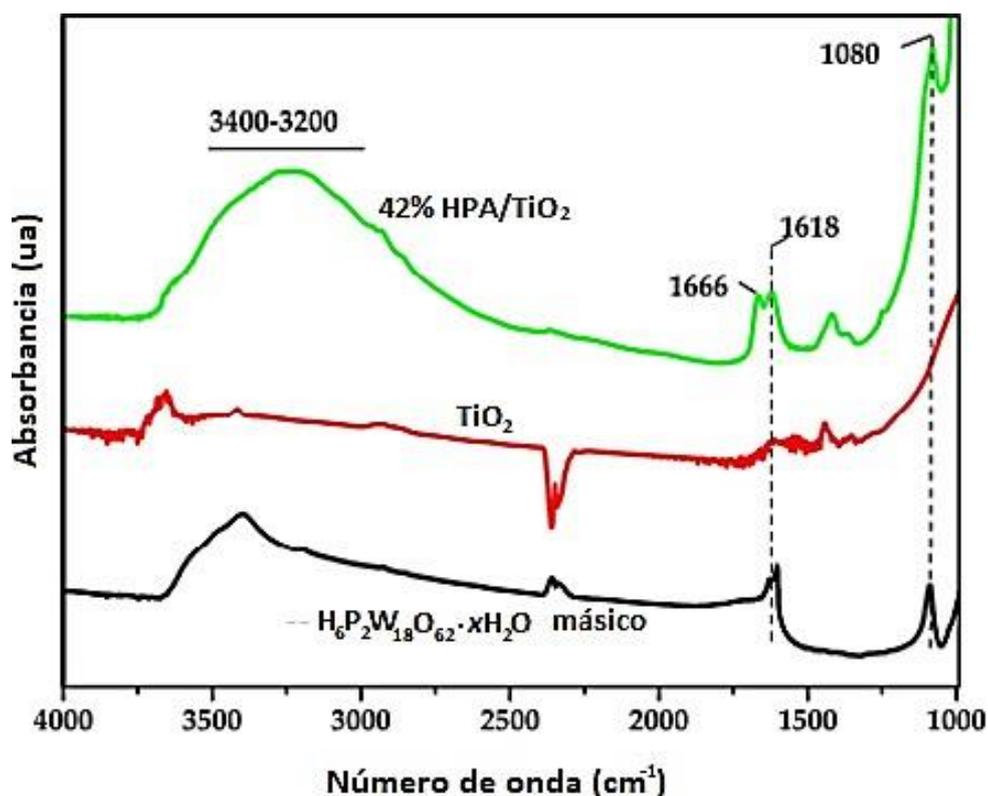
La masa inicial de heteropoliácido utilizada en este análisis fue de 6,06 mg, siendo la primera pérdida de masa de 0,592 mg y la segunda de 0,038 mg, con una pérdida de masa total de 0,636 mg de agua. A partir de estos datos, es posible concluir que la masa de HPA anhidro es de 5,424 mg (los cálculos se encuentran en el Anexo 1). El peso molecular del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson anhidro  $H_6P_2W_{18}O_{62}$  es de 4369,06 g.mol<sup>-1</sup>. Por lo tanto, la cantidad de moles de HPA que corresponden a 5,424 mg (masa anhidra) resulta igual a  $1,241 \times 10^{-6}$  moles. De la misma manera, a partir del peso molecular del agua se determinó que la pérdida total de la misma fue igual a  $3,533 \times 10^{-5}$  moles. En base a la masa perdida a cada temperatura, se determinó que hay 26,5

moles de moléculas de agua por cada mol de heteropoliácido y en la segunda desorción hay una pérdida de 2 moles de agua por mol de heteropoliácido. De esta manera, el análisis termogravimétrico permitió establecer la presencia de 28,5 moles de moléculas de agua por mol de heteropoliácido, proporcionando una la fórmula molecular del heteropoliácido hidratado siendo la misma  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5 H_2O$ .

Utilizando el dato del peso molecular correspondiente del HPA hidratado y los resultados del análisis por espectroscopia dispersiva de energía de rayos X EDS que se presenta en la Tabla 5.1. y 5.2 se calculó la cantidad exacta de HPA hidratado soportado sobre  $TiO_2$ . Los detalles de los cálculos se presentan en el Anexo 2.

### **5.1.2. Análisis molecular por espectrofotometría infrarroja: investigación de la estructura del heteropolianión fosfotúngstico $P_2W_{18}O_{62}^{-6}$**

La Figura 5.2 muestra los espectros infrarrojos del HPA soportado sobre dióxido de titanio 42% p/p HPA/ $TiO_2$  junto con los espectros del óxido utilizado como soporte y del HPA másico. La señal que se encuentra presente en  $1080\text{ cm}^{-1}$  se asigna a la vibración del enlace P-O del anión  $P_2W_{18}O_{62}^{-6}$  y es considerada como la huella digital del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson (Matkovic et al., 2014; Matkovic et al., 2015; Sambeth et al., 2003). Las señales centradas en  $1618\text{ cm}^{-1}$  y  $1666\text{ cm}^{-1}$  corresponden a moléculas de agua fisisorbidas y a aquellas que interaccionan con los heteropolianiones en el interior de la red del HPA, respectivamente. Finalmente, la banda ancha que se observa en  $3244\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a vibraciones O-H.

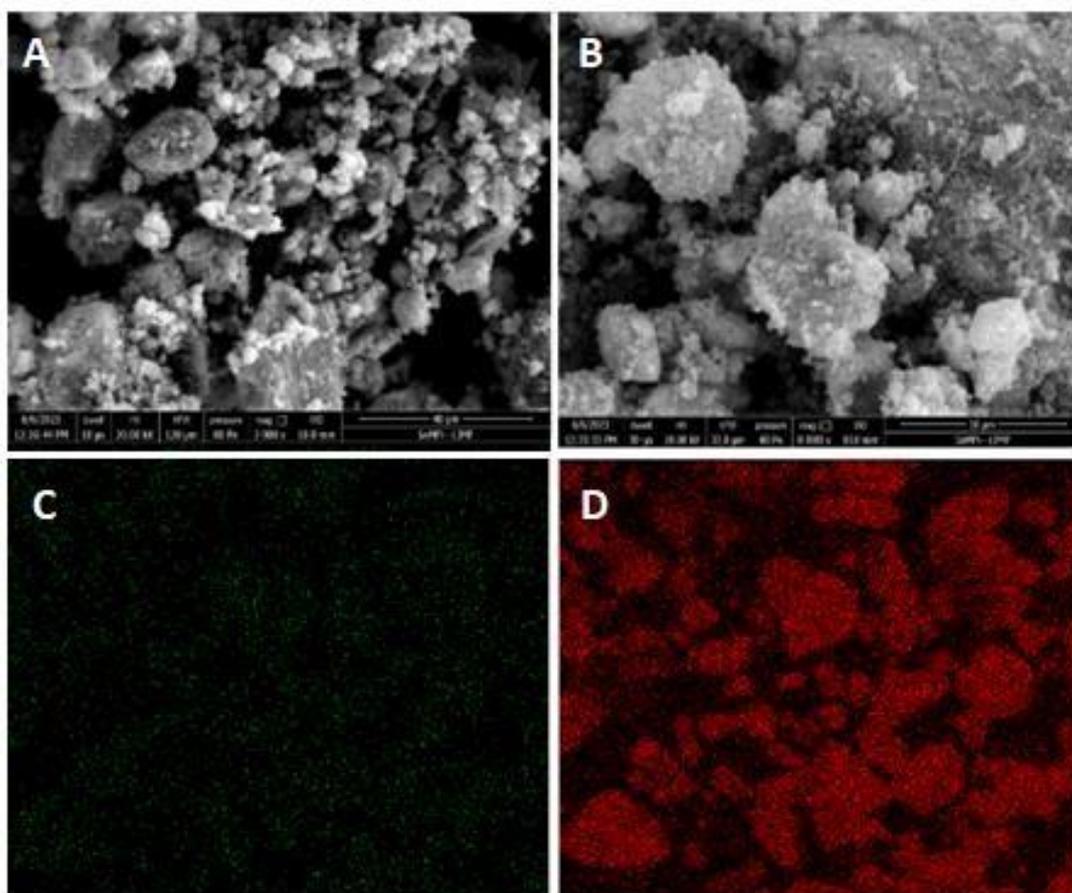


**Figura 5.2.** Espectro infrarrojo del heteropolíácido fosfotúngstico de Wells-Dawson  $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}\cdot 28.5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{TiO}_2$  anatasa y HPA soportado sobre  $\text{TiO}_2$  42% p/p HPA/ $\text{TiO}_2$

El espectro infrarrojo del HPA soportado sobre dióxido de titanio al 42% p/p posee las vibraciones características del HPA fosfotúngstico de Wells-Dawson másico. Esta observación, permite asegurar que la estructura del heteropolianión  $\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{6-}$  se mantiene intacta luego de la dispersión sobre el soporte oxídico y que, en ese porcentaje, se encuentra disperso en forma cristalina. Esto último, fue corroborado con el análisis mediante microscopía electrónica de barrido que se discutirá a continuación.

### 5.1.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido y microsonda de electrones: estudio textural y de la dispersión del HPA sobre $\text{TiO}_2$

Las Figuras 5.3 A y B presentan las micrografías del heteropolíácido soportado sobre dióxido de titanio 42% p/p HPA/ $\text{TiO}_2$  obtenidas con un microscopio electrónico de barrido medioambiental ESEM. Asimismo, las figuras C y D muestran el análisis de tungsteno y titanio realizado con una microsonda de electrones.



**Figura 5.3.** Imágenes de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido. Micrografías superiores con aumentos de 2000× (A) y 8000× (B). Mapeo de tungsteno (C) y titanio (D).

Las imágenes A y B del material 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> muestran cristales de aspecto circular del heteropoliácido fosfotúngstico disperso sobre la superficie de estructuras más grandes y de aspecto globular que corresponden al dióxido de titanio. Además, en las imágenes C y D el mapeo de titanio y tungsteno a través de una microsonda de dispersión de electrones evidenció que la dispersión del heteropoliácido sobre el soporte oxídico fue uniforme.

A partir del análisis elemental por espectroscopia de dispersión de rayos X EDS, y de la determinación de la fórmula molecular del HPA se pudo calcular la relación tungsteno/titanio W/Ti presentes en distintas zonas de una muestra de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>. En la Tabla 5.1 se muestran los resultados de dicho análisis y en el Anexo 2 se detallan los datos obtenidos mediante esta técnica y los cálculos realizados. Así como también para la muestra del catalizador 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.1.** Porcentaje de W y Ti presentes en distintas zonas de una muestra de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> analizada por microsonda de dispersión de electrones, relación peso en peso de W/Ti y su desviación estándar.

Peso de W (%)	Peso de Ti (%)	Relación peso en peso de W/Ti	Desviación estándar
30,86	34,03	0,907	0,009
27,90	35,20	0,793	0,008
27,22	35,63	0,764	0,008
22,46	34,41	0,653	0,007
27,92	35,80	0,780	0,008
27,94	36,12	0,774	0,008
34,05	30,33	1,123	0,010
27,51	37,25	0,739	0,008

En promedio la relación de W/Ti para la muestra 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> es de 0,813 con una desviación estándar de 0,008. Este resultado provee evidencias de que el heteropolíácido se encuentra uniformemente disperso sobre la superficie del soporte oxidico.

#### 5.1.4. Determinación de la superficie específica por el método BET

Se determinó el área superficial del HPA másico H<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>·28,5H<sub>2</sub>O; y de las heteropolisales con estructura Wells-Dawson de manganeso Mn<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>·31H<sub>2</sub>O y níquel Ni<sub>4,6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>·2,7H<sub>2</sub>O. Asimismo, se realizó la determinación del área superficial del heteropolíácido fosfotúngstico de Wells-Dawson soportado sobre TiO<sub>2</sub> con 2 contenidos, uno de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y otro de 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>. Los datos correspondientes se encuentran en la Tabla 5.2 mostrando que los materiales másicos presentan bajas áreas superficiales, siendo estas iguales a 1,38; 0,96 y 1,21 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, correspondientes al ácido, sal de manganeso y de níquel, respectivamente. Sin embargo, al soportar el HPA sobre dióxido de titanio, el área del material pasa a ser 45,80 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, para el caso del 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y 26,80 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> al soportarlo en un 42% p/p, observándose que la dispersión sobre un soporte oxidico aumenta considerablemente

el área superficial del HPA. En este contexto, el incremento del área expuesta de la fase activa conduce a una mayor accesibilidad de los sitios activos para interactuar con los reactivos. Adicionalmente, el análisis de la superficie específica de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> indicó que el material posee un volumen de poros igual a 0,099 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>. Si bien, este valor es pequeño es importante destacar que los heteropolioxoaniones presentan el fenómeno de catálisis pseudolíquida (o másica de tipo I). El mismo involucra la difusión de los reactivos en la red tridimensional de los heteropolicompuestos como el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson (Missoni, 2001). La estructura tridimensional de este tipo de materiales consiste en una red de heteropolianiones que interactúan con moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno generando túneles entre los aniones. La red de túneles del HPA generada por la presencia de moléculas de agua permite que los reactivos atraviesen toda la estructura del HPA, accediendo a una mayor cantidad de sitios activos en comparación con la catálisis estrictamente superficial. Este es el mecanismo que se lleva a cabo en una disposición bidimensional de moléculas de heteropoliácido, como en el caso del 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> que se encuentra por debajo del porcentaje que forma una monocapa (Matkovic et al., 2014). Según estudios reportados previamente, la cobertura en monocapa del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson dispersado sobre dióxido de titanio anatasa correspondería a un 19,4% p/p de HPA/TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.2.** Área superficial del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson másico y dispersado sobre TiO<sub>2</sub> y de sus heteropolisales de Mn y Ni.

Material	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)
H <sub>6</sub> P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> O <sub>62</sub> ·28,5 H <sub>2</sub> O	1,38
Mn <sub>3,4</sub> P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> O <sub>62</sub> ·31H <sub>2</sub>	0,96
Ni <sub>4,6</sub> P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> O <sub>62</sub> ·2,7H <sub>2</sub> O	1,21
4% HPA/TiO <sub>2</sub>	45,80
42% HPA/TiO <sub>2</sub>	26,80

## 5.2 INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO UTILIZANDO COMO CATALIZADORES HETEROPOLICOMPUESTOS

### 5.2.1 Estudio preliminar de la actividad catalítica de los heteropolicompuestos con estructura del tipo Wells Dawson

Se llevó a cabo la investigación de la esterificación de ácido oleico con metanol utilizando como catalizadores el heteropoliácido fosfotúngstico,  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5H_2O$ , másico y dispersado sobre dióxido de titanio, así como también de las heteropolisales de manganeso y níquel,  $Mn_{3,4}P_2W_{18}O_{62} \cdot 31H_2O$  y  $Ni_{4,6}P_2W_{18}O_{62} \cdot 2,7H_2O$ . Esta reacción, que se utilizó como test, permitió comparar la actividad al respecto de la reacción de esterificación, de los distintos materiales en estudio y establecer cuáles serían potencialmente los más adecuados para catalizar posteriormente la transesterificación de aceite usado en cocción.

La Tabla 5.3 muestra la actividad específica de los materiales en función de la cantidad de catalizador, la relación molar ácido oleico: metanol y el tiempo de reacción. La actividad específica se calculó a partir de la ecuación 4.16 presentada en el Capítulo 4, en la Sección 4.7, teniendo la consideración de restar los micromoles convertidos en la reacción sin catalizador que se toma como la reacción blanco.

**Tabla 5.3.** Relación molar ácido oleico: metanol, tiempo de reacción y actividad específica en la esterificación de ácido oleico a 85°C catalizada con heteropolicompuestos másicos con estructura Wells-Dawson.

Material	Relación molar	Tiempo	Actividad específica
	ácido oleico: metanol	(h)	( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5 H_2O$ (HPA)	1:1	1	27,63
	1:1	3	7,75
	1:3	3	11,97
	1:7	3	48,55
$Mn_{3,4}P_2W_{18}O_{62} \cdot 31H_2O$	1:7	3	10,10
	1:7	24	0,59
$Ni_{4,6}P_2W_{18}O_{62} \cdot 2,7H_2O$	1:1	1	14,68
	1:7	3	10,61

En este sentido, una actividad específica nula correspondería a los casos en los que la conversión de ácido oleico no superó a la de la esterificación sin catalizador. Los ensayos preliminares se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo 4, Sección 4.1.1.

Analizando los valores presentados en la tabla se observa que, al usar una relación molar ácido oleico: metanol 1:1, en 1 hora de reacción, la actividad específica que presentó el HPA fue de  $27,63 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ , casi el doble que la presentada por la sal de níquel,  $14,68 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Asimismo, el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson presentó una mayor actividad específica que las heteropolisales al llevar a cabo la reacción con una relación molar 1:7 y 3 horas. Esta observación, se correlaciona con la mayor concentración de sitios ácidos de Brønsted que posee el heteropoliácido con respecto a las sales de manganeso y níquel. En el trabajo presentado por Matkovic y colaboradores en 2019, se informaron estudios sobre la concentración de sitios ácidos de Brønsted y Lewis en el  $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62} \cdot 28,5\text{H}_2\text{O}$  soportado sobre dióxido de titanio en un 18% p/p y en las sales  $\text{Mn}_{3,4}\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62} \cdot 31\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ni}_{4,6}\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62} \cdot 2,7\text{H}_2\text{O}$  dispersadas en  $\text{TiO}_2$  con un contenido de 17% p/p. En dicho trabajo se indica que la sal de manganeso posee una concentración de  $14,3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios Lewis y  $8,5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios de Brønsted, por otro lado la heteropolisal de níquel presenta una concentración de  $12,0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios Lewis y  $4,4 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios de Brønsted, si se comparan estos valores con el HPA que presenta  $4,3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios Lewis y  $12,6 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de sitios de Brønsted, se encuentra que el heteropoliácido presenta una mayor relación de sitios ácidos Brønsted/Lewis (Matkovic et al., 2019).

### **5.2.2. Investigación de la actividad catalítica del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson másico y soportado en la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol**

En esta sección se profundiza la investigación de la actividad catalítica del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson másico que resultó el heteripolicompuesto más promisorio para catalizar la esterificación de ácido oleico con metanol. Asimismo, se evaluó la actividad del HPA soportado sobre  $\text{TiO}_2$  que, como se

discutió anteriormente, posee mayor superficie específica y que eventualmente, podría recuperarse y reusarse más eficazmente que el material másico.

La Tabla 5.4 muestra los resultados de la esterificación de ácido oleico catalizado con el HPA másico  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5H_2O$  y soportado en contenido de 42% HPA/ $TiO_2$  y 4% HPA/ $TiO_2$ . En la tabla se consigna la actividad específica en función de la masa de fase activa, la relación molar ácido oleico: metanol y el tiempo de reacción. La metodología de reacción se especifica en las secciones 4.1.1 y 4.1.2 del Capítulo 4.

**Tabla 5.4.** Actividad específica del heteropoliácido másico y dispersado sobre dióxido de titanio en la esterificación de ácido oleico a 85°C con distintas relaciones molares de ácido oleico: metanol y tiempo de reacción.

Material	Masa de HPA activo (mg)	Relación molar ácido oleico: metanol	Tiempo (h)	Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
HPA	200	1:1	1	27,63
	200	1:1	3	7,75
	200	1:1	3	11,97
	200	1:7	3	48,55
	8,6	1:7	3	180,89
4% HPA/ $TiO_2$	8,6	1:7	3	0
42% HPA/ $TiO_2$	9,5	1:1	1	0
	6,8	1:3	1	128,20
	10,0	1:3	1	142,80
	10,0	1:3	3	115,17
	10,6	1:7	1	41,26
	9,3	1:7	3	70,78
	14,0	1:7	1	0
	20,2	1:7	3	0

En primer lugar, resulta interesante comparar los resultados de actividad específica de la esterificación de ácido oleico con masas similares de 4% HPA/ $TiO_2$  y 42% HPA/ $TiO_2$  que se corresponde a una fase activa de 8,6 mg y 9,3 mg, respectivamente, con una relación molar de ácido oleico: metanol 1:7 luego de tres horas de reacción. En este contexto, el material de 4% p/p HPA/ $TiO_2$  correspondiente a un bajo contenido de fase

activa no presentó actividad catalítica debido a que la conversión obtenida no fue mayor a la alcanzada en la reacción sin catalizador. Sin embargo, el heteropoliácido soportado en un 42% p/p sobre  $\text{TiO}_2$  presentó una actividad igual a  $70,78 \mu\text{mol mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

La observación de que el 4% p/p de HPA/ $\text{TiO}_2$  (correspondiente a un contenido de  $1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  de HPA) es inactivo, en comparación con el 42% p/p de HPA/ $\text{TiO}_2$ , este resultado se atribuye a la estructura del HPA. De hecho, investigaciones previas demostraron que un bajo contenido del heteropoliácido fosfotúngstico soportado sobre  $\text{TiO}_2$  (de  $0,7$  a  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) se dispersa como una monocapa de unidades de HPA aisladas. Mientras que, en contenidos superiores a  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  forma cristales sobre el soporte lo que le confiere una estructura similar a la del material másico (Matkovic et al., 2014). Esta afirmación fue corroborada al estudiar el 42% p/p HPA/ $\text{TiO}_2$  mediante espectrometría infrarroja y microscopía electrónica de barrido, como se discutió en la sección 5.1.

Al analizar los datos presentados en la Tabla 5.4 puede observarse que el uso del heteropoliácido másico, posee una mayor actividad al utilizar una masa del mismo de  $8,6 \text{ mg}$  que al utilizar  $200 \text{ mg}$ . La actividad específica en el primer caso fue de  $180,89 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  mientras en el segundo caso fue de  $48,55 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las mismas condiciones de reacción. Asimismo, se observa que en los ensayos con cantidades similares de HPA másico y soportado, correspondientes a  $8,6 \text{ mg}$  de HPA másico y  $10,0 \text{ mg}$  de HPA dispersado, el ácido soportado presenta una actividad específica comparable para una relación ácido oleico: metanol más baja a saber 1:3 en comparación con la relación 1:7, así como un menor tiempo de reacción.

Dado las ventajas de ser recuperados y reutilizados que presentan los materiales soportados, se continuó con una investigación más exhaustiva sobre el uso del HPA soportado.

### **5.2.3 Estudio de las condiciones óptimas de la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol utilizando como catalizador 42% p/p HPA/ $\text{TiO}_2$**

Se estudió a través del ajuste de los datos experimentales mediante el uso de superficies no lineales, la influencia de la cantidad de catalizador, la relación molar ácido oleico: metanol, el tiempo de reacción, velocidad de agitación y temperatura en la esterificación de ácido oleico catalizada con 42% p/p HPA/ $\text{TiO}_2$ . Esta investigación se

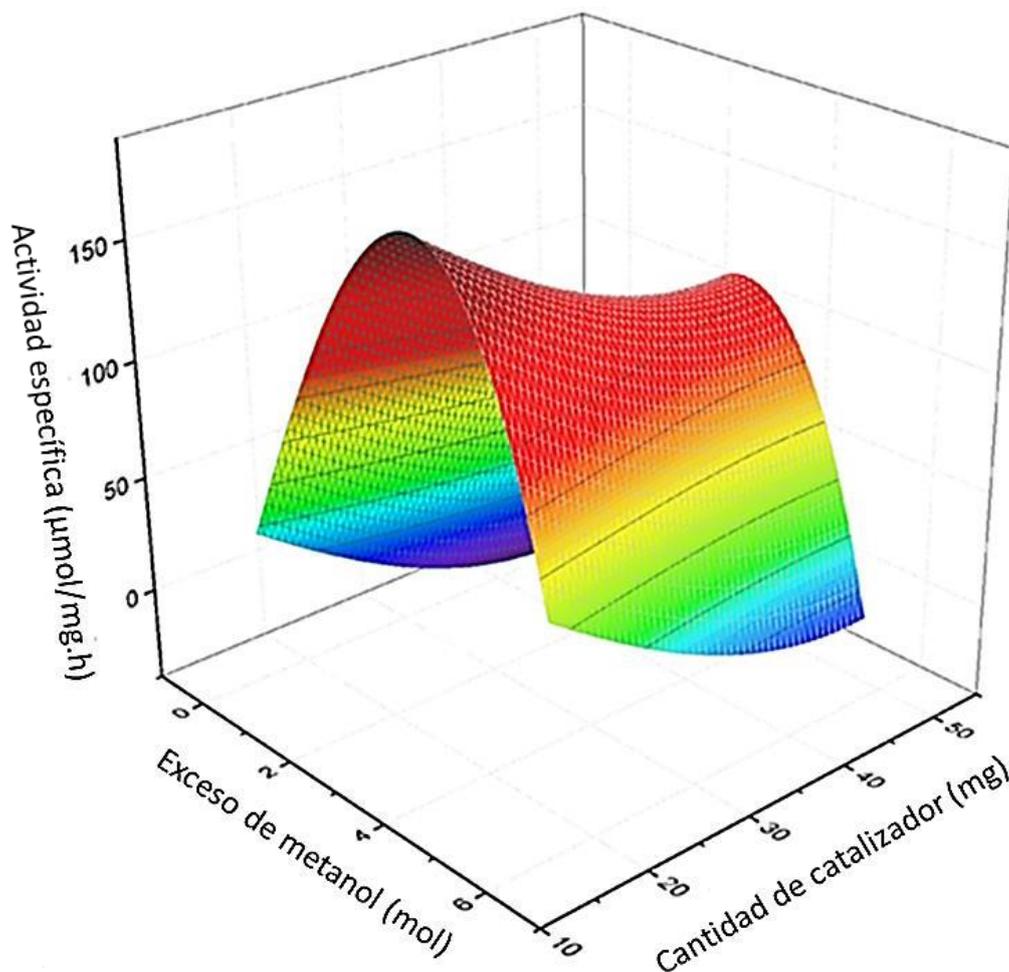
realizó en colaboración con la Dra. Claudia Ruscitti (Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas UNLP) según se describió en la sección 4.8 del Capítulo 4.

En la Figura 5.4 se presenta la superficie de respuesta que involucra la influencia de la cantidad de catalizador, así como también del exceso de metanol en la actividad específica del catalizador soportado en la esterificación del ácido graso con metanol. Para el desarrollo de este gráfico se utilizaron los datos calculados de actividad específica del catalizador en las reacciones llevadas a cabo con diferentes cantidades de metanol (en el gráfico se encuentra indicado como moles en exceso de metanol), así como la distinta cantidad de catalizador usado. Los datos numéricos correspondientes al gráfico se presentan en la Tabla 1 del Anexo 3.

El análisis de la superficie de respuesta permite proponer un modelo con el cual se puede establecer una relación entre las condiciones de reacción, en este caso entre el exceso de metanol, la cantidad de catalizador, y la actividad específica observada. El modelo propuesto para la relación entre estos parámetros se presenta en la ecuación 5.1:

$$Z = Z_0 + A_1X + B_1Y + A_2X^3 + B_2Y^3 \quad (5.1)$$

donde X representa el exceso de metanol en moles, Y es la cantidad de catalizador 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> en mg, y Z es la actividad específica en  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Los coeficientes obtenidos fueron  $Z_0 = 86,84602$ ;  $A_1 = 64,95299$ ;  $B_1 = -3,97438$ ;  $A_2 = -1,65461$ ;  $B_2 = 6.17705 \cdot 10^{-4}$  con coeficientes  $R^2 = 0,9453$  y  $\text{adj}R^2 = 0,83589$ .



**Figura 5.4.** Ajuste superficial no lineal de la actividad específica de la esterificación del ácido oleico con metanol catalizada con 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> en función de la cantidad de catalizador y metanol en exceso, respecto a la relación estequiométrica (1 mol de alcohol por 1 mol de ácido oleico), a 85°C, 150 rpm durante 1 h de reacción.

El gráfico de superficie de respuesta indica que los mejores rendimientos catalíticos se alcanzan con 16 mg a 24 mg del catalizador, lo que corresponde a aproximadamente 10 mg de HPA activo. Asimismo, se observa que la actividad específica disminuye al aumentar la masa de catalizador.

El exceso de metanol representado en el gráfico muestra los moles de alcohol en exceso con respecto a la relación molar estequiométrica de ácido oleico: metanol 1:1. Por lo tanto, la relación molar 1:1 corresponde a 0 moles de metanol en exceso, 1:3 a 2 moles de metanol en exceso y 1:7 a 6 moles de metanol en exceso. En este contexto, el exceso de metanol que resulta óptimo, corresponde a 2 moles, lo que se traduce a una

relación molar óptima de 1:3. Esto evidencia que se requiere un exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia los productos, mientras que un gran exceso del mismo en la reacción podría perjudicar la actividad del catalizador, probablemente relacionado con la desorción de la fase activa hacia el medio líquido.

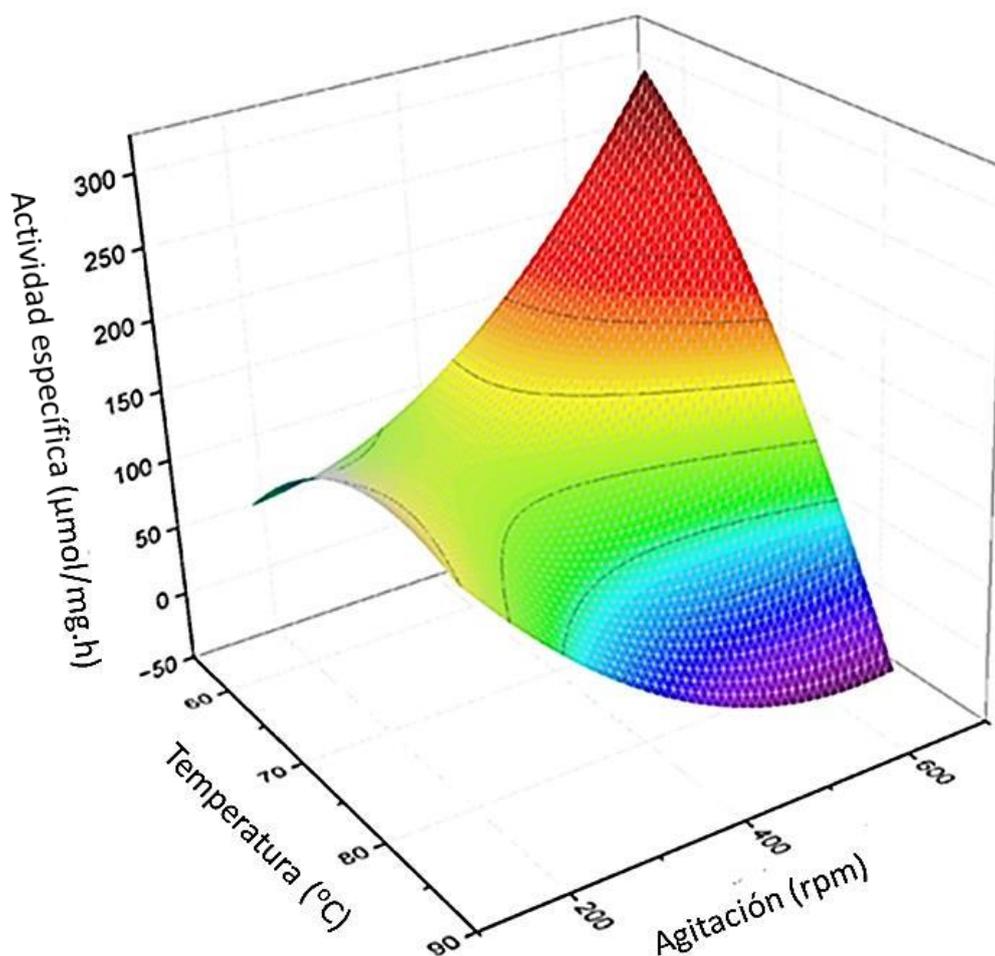
Puede observarse que, la actividad específica más alta fue de  $142,80 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ . La misma se obtuvo al realizar la esterificación de 20,00 g de ácido oleico con una relación molar igual a 1:3 y 24 mg de catalizador 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>, que corresponde a un 0,12% p/p con respecto al ácido oleico y contiene 10 mg de heteropoliácido soportado sobre el TiO<sub>2</sub>.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio del efecto de la temperatura de reacción y la velocidad de agitación en la esterificación de ácido oleico y se evaluó la actividad del heteropoliácido soportado. La Figura 5.5 muestra la dependencia de la actividad específica con la velocidad de agitación y la temperatura al usar 24 mg de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y una relación molar ácido: metanol 1:3.

Los datos que permitieron el desarrollo de este gráfico se encuentran en la Tabla 2 que se presenta en el Anexo 3. El modelo matemático propuesto para la relación entre la actividad específica, la temperatura y la velocidad de agitación se presenta en la ecuación 5.2:

$$Z = Z_0 + AX + BY + CX^2 + DY^2 + EXY \quad (5.2)$$

donde  $Z_0 = -1629,26739$ ;  $A = 43,73342$ ;  $B = 1,71111$ ;  $C = -0,2508$ ;  $D = 8,30906 \cdot 10^{-4}$  y  $E = -0,03197$ , con coeficientes iguales a  $R^2 = 0,81471$  y  $\text{adj}R^2 = 0,62942$ .



**Figura 5.5.** Ajuste superficial no lineal de la actividad específica del catalizador en función de la velocidad de agitación y la temperatura de reacción en la esterificación del ácido oleico con metanol usando 24 mg de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> con una relación molar ácido oleico: metanol 1:3, durante 1 h de reacción.

En el gráfico puede observarse que se requiere una alta velocidad de agitación, por encima de 600 rpm, para superar las restricciones de difusión. Por otro lado, la temperatura óptima se encuentra en aproximadamente los 60 $^{\circ}\text{C}$ . La misma está por debajo del punto de ebullición del metanol, esto evita la rápida volatilización del alcohol del medio de reacción. Por este motivo, como el aceite tiene un punto de ebullición más alto que el metanol, el punto de ebullición del alcohol se podría considerar la mejor temperatura de reacción (Xiao & Gao, 2011).

De acuerdo a los datos presentados al respecto de la investigación de los distintos parámetros que afectan a la reacción de esterificación y teniendo en cuenta la información obtenida mediante el análisis matemático por medio del ajuste de

superficies no lineales que permitió modelar la optimización de los datos. Se encontró que con 24 mg de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> se alcanzó una actividad específica de 306,8  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$  para la esterificación de ácido oleico con metanol siendo las condiciones óptimas de reacción para 20,00 g de ácido oleico, una relación molar ácido oleico: metanol 1:3, 60°C, 650 rpm y 1 hora de reacción.

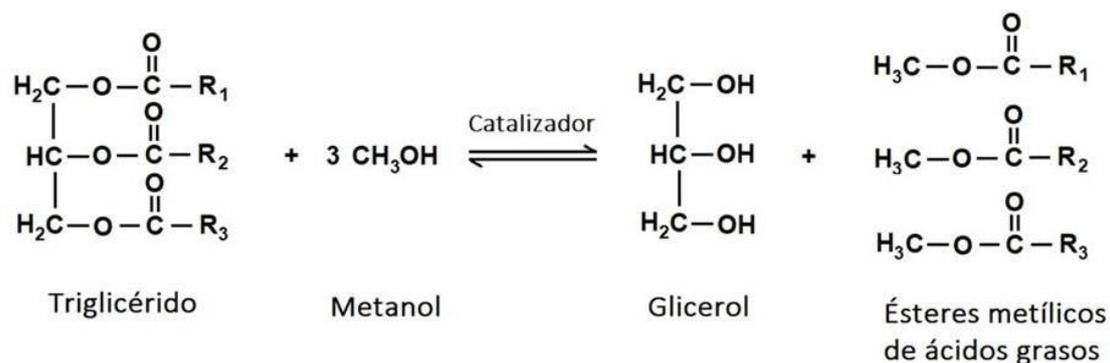
### **5.3. INVESTIGACIÓN DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN UTILIZANDO COMO CATALIZADOR ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO DE WELLS-DAWSON SOPORTADO**

#### **5.3.1 Investigación de la actividad catalítica de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> en la transesterificación de aceite vegetal usado**

Los resultados mostrados en la sección 5.2 indican que el HPA soportado (42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>) podría ser un catalizador promisorio en la reacción de transesterificación de sustratos más complejos como es el aceite de cocina usado. Siguiendo esta hipótesis, se llevó a cabo el estudio de la actividad catalítica del HPA soportado en la transesterificación de aceite usado en cocción con metanol en distintas condiciones de reacción. En este sentido, se llevaron a cabo reacciones de transesterificación con 20,0 g de aceite usado, metanol y 24 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> a 60°C y 650 rpm. La elección de estas condiciones se fundamenta en la información obtenida a partir del estudio de la actividad de este catalizador en la esterificación de ácido oleico.

Los experimentos realizados comenzaron con la determinación de la relación molar óptima de aceite: metanol, se realizó la transesterificación del aceite partiendo de la relación molar óptima 1:3 de la esterificación de ácido oleico, ésta corresponde a un exceso de 2 moles de alcohol por mol de ácido graso. A fin de llevar a cabo la transesterificación de los triglicéridos, se ajustó la relación molar aceite: metanol a 1:9 para mantener la misma proporción ácido graso/alcohol. Este ajuste se realizó ya que los ácidos grasos libres generan un enlace éster al reaccionar con el metanol, por otro lado, los triglicéridos poseen tres enlaces éster que producen de hidrolizarse completamente tres ácidos grasos que podrían reaccionar para generar ésteres metílicos de ácidos grasos (ver Esquema 5.1). Adicionalmente, se investigó el efecto del aumento y

disminución de las cantidades de alcohol en la reacción de transesterificación, fueron estudiadas relaciones molares iguales a 1:7 y 1:12.



**Esquema 5.1.** Reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol.

Por otro lado, se estudió la influencia del tiempo de reacción en la transesterificación a fin de determinar si la reacción de un sustrato más complejo como es el triglicérido podría llegar a requerir un mayor tiempo.

**Tabla 5.5.** Conversión (%), rendimiento a ésteres (%), selectividad (%) hacia glicerol (Gli), mono- y diglicéridos (MG y DG), índice de acidez y actividad específica en la transesterificación de aceite usado en cocción con metanol catalizada con 24 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> a 60°C y 650 rpm durante 3, 6 y 24 h de reacción y diversas relaciones molares aceite: metanol.

Relación molar aceite: metanol	Tiempo (h)	Conversión (%)	Rendimiento a ésteres (%)	Selectividad (%)			Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Índice de acidez
				Gli	MG	DG		
1:7	3	0,4	0	100	0	0	0	2,96
1:7	6	0,4	0	37,6	0	62,4	0	1,90
1:7	24	3,6	2,6	68,5	0	31,6	1,94	0,70
1:9	3	27,5	26,5	100	0	0	195,9	2,76
1:9	6	26,4	25,8	100	0	0	94,1	2,37
1:9	24	22,5	21,9	100	0	0	0	1,33
1:12	3	0	0	0	0	0	0	1,66
1:12	6	1,4	0,6	100	0	0	2,3	1,20
1:12	24	0,3	0	94,8	5,2	0	0	0,95

En la Tabla 5.5 pueden observarse los datos obtenidos de los experimentos realizados teniendo en cuenta el tiempo de reacción, las distintas relaciones molares aceite: alcohol, la conversión de glicéridos, la selectividad hacia la formación de glicerol, mono- y diglicéridos y la actividad específica luego de la transesterificación.

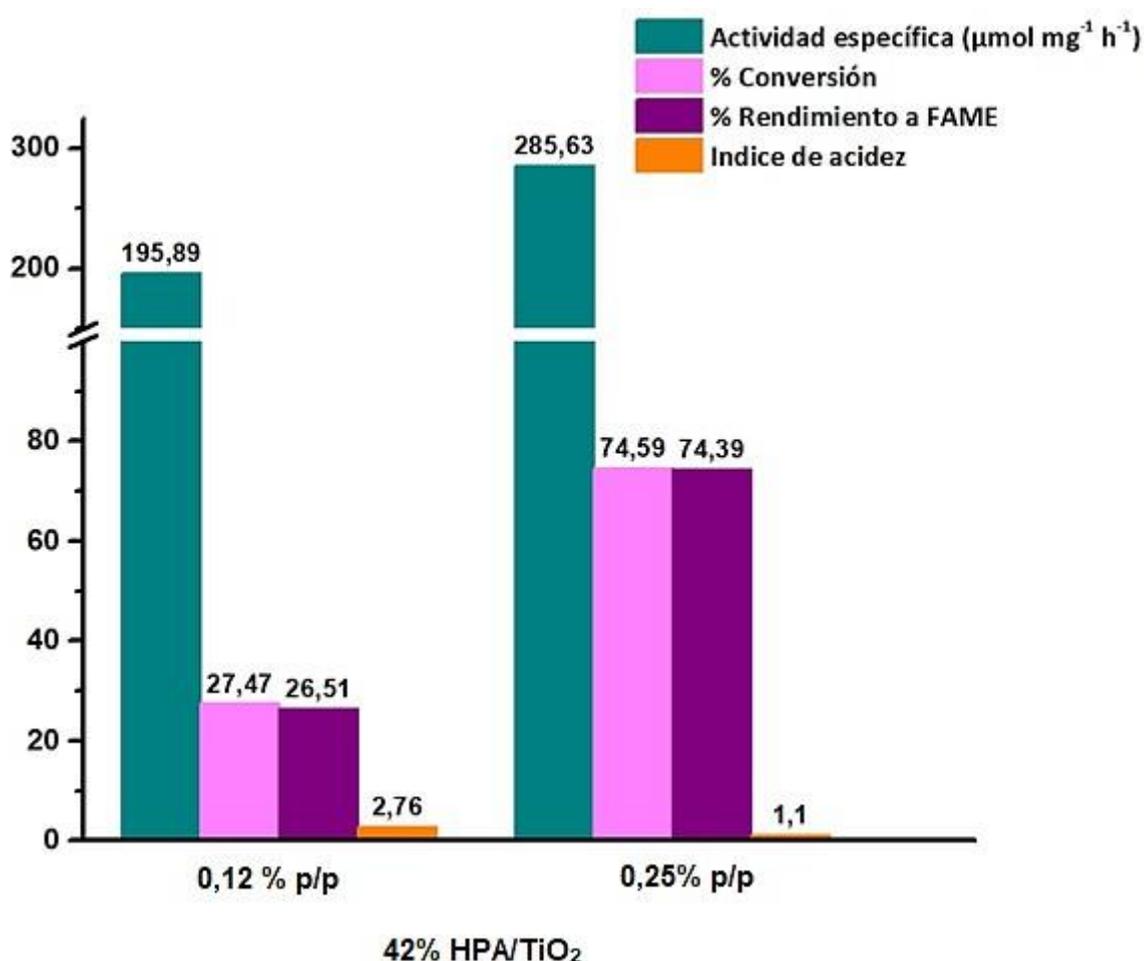
Al analizar la tabla puede verse que, la transesterificación de aceite usado catalizada con 42% HPA/TiO<sub>2</sub> con una relación molar aceite: metanol de 1:9 en 3 horas de reacción, alcanza una conversión de 27,5% de los glicéridos, con un rendimiento de 26,5% a ésteres metílicos FAME. Además, la transesterificación genera glicerol y una cierta proporción de ácidos grasos libres que se cuantifican en el valor de 2,76 del índice de acidez. Sin embargo, cuando las reacciones se realizaron con relaciones molares 1:7 y 1:12, una menor y una mayor cantidad de alcohol, las conversiones obtenidas fueron considerablemente bajas. En este sentido, se encontró que la conversión de glicéridos en la transesterificación disminuye cuando la misma se lleva a cabo con una relación molar que se encuentra por debajo o por encima de la relación ácido graso: metanol 1:3 al igual que en la esterificación. Por consiguiente, la relación molar ácido oleico: metanol que resulta óptima es 1:3, mientras que la relación molar aceite: metanol óptima es 1:9. Esto se debe a que se requiere un cierto exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia la formación de los ésteres de ácidos grasos, sin embargo un gran exceso perjudica la actividad catalítica del catalizador, como se discutió en la Sección 5.2.3.

La baja conversión del aceite y la formación de monoglicéridos y diglicéridos al utilizar una relación molar aceite: metanol de 1:7, proporcionan pruebas de una transesterificación incompleta de los triglicéridos.

Asimismo, según se observa en la Tabla 5.5, la actividad específica y el rendimiento a FAME prácticamente no se modifican luego de las 3 horas de reacción en la relación aceite: metanol 1:9. En este contexto, es posible concluir que el mejor desempeño catalítico se alcanzó en las condiciones operativas que se calcularon mediante la aplicación de la metodología de ajuste de superficie no lineales en la esterificación de ácido oleico con metanol. Esta observación evidencia que la aplicación de la reacción test es una metodología que resulta confiable para la optimización de las condiciones operativas.

A fin de aumentar la conversión de los triglicéridos presentes en el aceite usado, se realizó un ensayo duplicando la cantidad de catalizador a un 0,25% p/p. En este contexto, se llevó a cabo la transesterificación de 20,00 g de aceite usado en cocción con metanol en una relación molar 1:9 a 60°C y 650 rpm durante 3 horas usando 49,6 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub>, el cual contiene 19,7 mg de heteropoliácido.

Los resultados de actividad específica, conversión de glicéridos, rendimiento a ésteres e índice de acidez de las transesterificaciones con 0,12 y 0,25% de catalizador en las condiciones explicitadas anteriormente se presentan en el gráfico de la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Actividad específica, conversión de glicéridos, rendimiento a ésteres e índice de acidez en las reacciones de aceite usado con 0,12 % p/p y 0,25% p/p, relación molar aceite: metanol 1:9, 60°C y 650 rpm durante 3 horas.

La Figura 5.6 muestra que la conversión de glicéridos y el rendimiento a FAME aumentan de 27,47 a 74,59% y de 26,51 a 74,39%, respectivamente, al duplicar la

cantidad de catalizador. Por lo tanto, se observó un aumento en la actividad específica del catalizador al llevar a cabo la transesterificación con 49,7 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub>. Asimismo, se encontró que el índice de acidez disminuyó evidenciando una menor formación de ácidos grasos libres.

La transesterificación de aceite usado requiere una mayor cantidad de HPA/TiO<sub>2</sub> en relación a la necesaria para catalizar la esterificación del ácido oleico. Este hecho podría atribuirse a la influencia de un sustrato más complejo en el mecanismo de transesterificación de triglicéridos catalizada con un heteropoliácido. Si bien el mecanismo de la transesterificación de triglicéridos con el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson no ha sido reportado en la literatura, es interesante comentar las investigaciones de Reinoso y colaboradores en relación a posibles mecanismos de reacción cuando se utilizan catalizadores sólidos. Los autores, demostraron que el mecanismo de transesterificación de triglicéridos con metanol catalizado con carboxilato de zinc ocurre mediante la coordinación del metanol con Zn<sup>+2</sup> para formar un grupo alcóxido Zn-OCH<sub>3</sub>. En una segunda etapa, el triglicérido forma un enlace con la especie alcoxi a través de un grupo carbonilo (Reinoso et al., 2013). La formación de alcóxidos catalizada con heteropoliácidos fosfotúngsticos en un mecanismo factible ya que estos materiales catalizan la deshidratación de metanol para formar dimetil éter y de isopropanol para formar propileno, lo que requiere especies de alcóxidos quimisorbidos (Gambaro & Briand, 2004).

En base a las investigaciones descritas en esta sección, es posible concluir que las condiciones más adecuadas para la transesterificación de aceite usado son: una relación molar aceite: metanol igual a 1:9; un porcentaje de catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> de 0,25% p/p, 60°C, 650 rpm y 3 horas de reacción.

### **5.3.2 Ensayos de reutilización del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la transesterificación de aceite usado**

El estudio del reuso del catalizador soportado se llevó a cabo en las condiciones óptimas encontradas, las cuales corresponden a una relación molar aceite: metanol 1:9, 0,25% p/p de 42% HPA/TiO<sub>2</sub>, 60°C, 650 rpm y 3 horas de reacción.

Como se detalló en el Capítulo 4, el catalizador fue separado del medio de reacción mediante una centrifugación y se volvió a utilizar en una nueva reacción en las mismas condiciones.

La Tabla 5.6 presenta los resultados de conversión, rendimiento a FAME, selectividad a glicerol, monoglicéridos y diglicéridos, e índice de acidez que se determinaron en tres reusos del catalizador.

**Tabla 5.6.** Conversión de glicéridos, rendimiento a ésteres de ácidos grasos, selectividad a glicerol, mono- y diglicéridos e índice de acidez en la transesterificación de aceite usado con HPA soportado en 3 ciclos de reuso.

Ciclo de reuso del catalizador	Conversión (%)	Rendimiento a FAME (%)	Selectividad (%)			Índice de acidez
			Glicerol	MG	DG	
1er uso	74,6	74,4	99,30	0,69	0	1,10
1er reuso	66,1	65,9	99,66	0	0,34	0,34
2do reuso	64,6	64,8	99,62	0	0,38	0,34
3er reuso	62,3	62,3	99,70	0	0,30	0,37

Puede observarse, que el catalizador presenta una disminución de aproximadamente el 10% de su actividad luego del primer reuso, lo cual podría atribuirse a la lixiviación de parte del heteropoliácido al medio de reacción. Luego del primer reuso, si bien se observó una disminución de las conversiones y rendimientos a FAME, las mismas son menores y podrían atribuirse a la pérdida de masa al centrifugar para separar el catalizador del medio de reacción.

En todos los casos, se encontró que la selectividad a glicerol es cercana al 100%, mientras que la formación a mono- y diglicéridos tanto en el primer uso como en las reacciones en las que se reusó el catalizador es insignificante. Por otro lado, se obtuvo una fase oleosa con un bajo índice de acidez lo que indica una baja formación de ácidos grasos y, por lo tanto, una alta selectividad a ésteres de ácidos grasos.

## 5.4 ESTABILIDAD DEL HETEROPOLIÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO DE WELLS-DAWSON SOPORTADO

En esta sección, se presenta la investigación de la estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en las reacciones de esterificación de ácido oleico y transesterificación de aceite con metanol.

### 5.4.1 Estudio de estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la esterificación de ácido oleico

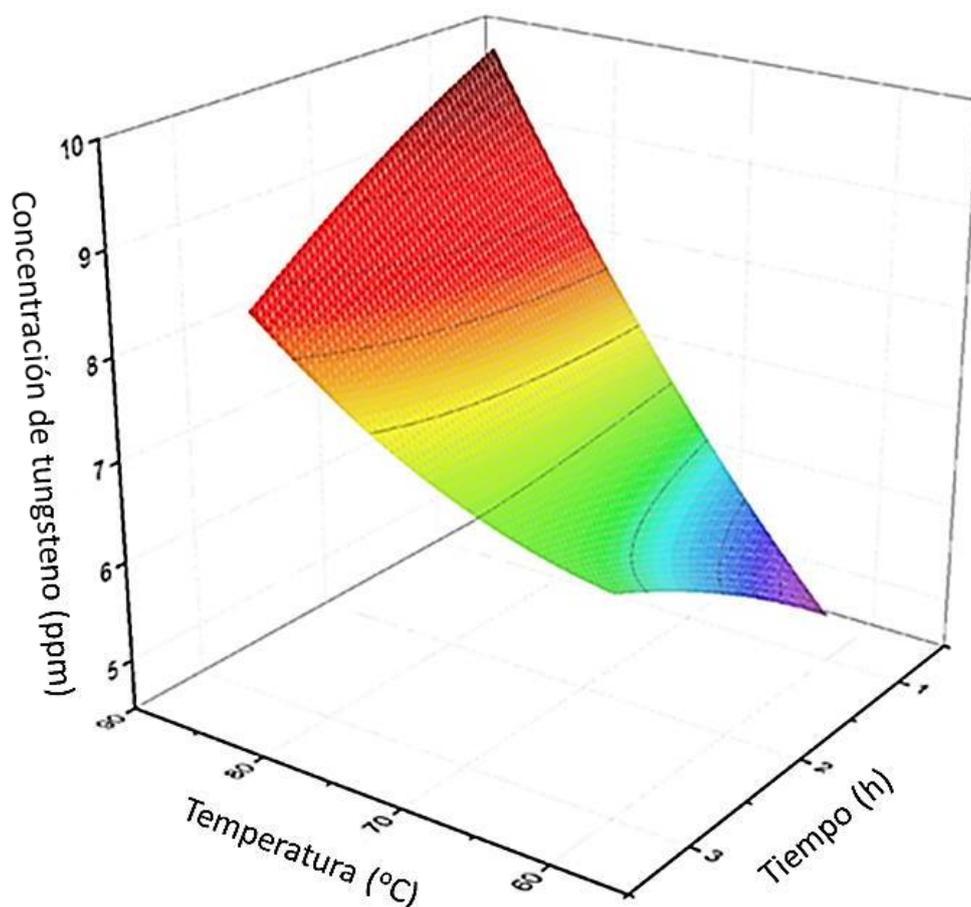
Con el fin de investigar la estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en los ensayos de esterificación de ácido oleico con metanol se analizó la presencia de tungsteno que podría provenir de la desorción del HPA. La cuantificación de tungsteno en los medios de reacción se realizó por Espectroscopia Óptica de Emisión (ICP-OES) según se detalló en el Capítulo 4. Se analizaron muestras provenientes de la esterificación llevada a cabo a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. Para la realización del gráfico se utilizaron los datos presentados en la Tabla 3 del Anexo 3. Y la ecuación utilizada fue la 5.3:

$$Z = A(X - 3)^2 + B(Y - 24)^2 + CXY + D \quad (5.3)$$

donde X es la temperatura en grados Celsius, Y es el tiempo de reacción en horas, y Z representa la concentración de tungsteno en ppm. Los coeficientes A, B, C, y D fueron iguales a: A= 0,00193; B= -0,11043; C= -0,06691 y D= 61,13596, con R<sup>2</sup> = 0,91093 y adjR<sup>2</sup>= 0,84412.

La Figura 5.7 muestra la concentración de tungsteno en el medio de reacción luego de la esterificación de ácido oleico con metanol al usar temperaturas entre 60 y 85°C y entre 1 y 3 horas de reacción. Para este estudio se analizaron medios de reacción de esterificaciones llevadas a cabo con 24 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub>, una relación molar 1:3 y 150 rpm. La superficie que se obtiene a través del análisis de los datos permite concluir que la desorción de la fase activa está influenciada por la temperatura y aumenta continuamente desde 60°C hasta 85°C independientemente del tiempo de reacción. Sin embargo, la concentración máxima de tungsteno lixiviado hacia el medio de reacción fue

de 9,8 ppm, que corresponde sólo a un 2,9 % de la masa de HPA soportado. Este estudio demuestra que el catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> es estable en la esterificación de ácido oleico incluso a altas temperaturas.



**Figura 5.7.** Ajuste superficial no lineal de la concentración de tungsteno (en ppm) detectada en los medios de reacción de la esterificación de ácido oleico con metanol catalizada con 24 mg de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en función de la temperatura y el tiempo de reacción, con una relación molar de ácido oleico: metanol 1:3 y 150 rpm.

#### 5.4.2 Estudio de estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la transesterificación de aceite usado en cocción

La estabilidad del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la reacción de transesterificación de aceite usado se investigó a través de la cuantificación de tungsteno en el medio de reacción con una metodología similar a la descrita en la sección anterior.

Para ello, se midió la concentración de tungsteno presente en los medios de reacción y se calculó la cantidad de heteropoliácido lixiviado durante la reacción de transesterificación.

La Tabla 5.7 muestra la concentración máxima de tungsteno que podría encontrarse en el medio de reacción en el caso de un 100% de lixiviación del HPA y la concentración de tungsteno encontrada a partir del análisis de los medios de reacción luego de la transesterificación de aceite usado con metanol usando una relación molar aceite: metanol igual a 1:9, 60°C, 650 rpm con distintas cantidades del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> y diferentes tiempos de reacción. Asimismo, en la última columna se puede observar el porcentaje de heteropoliácido lixiviado.

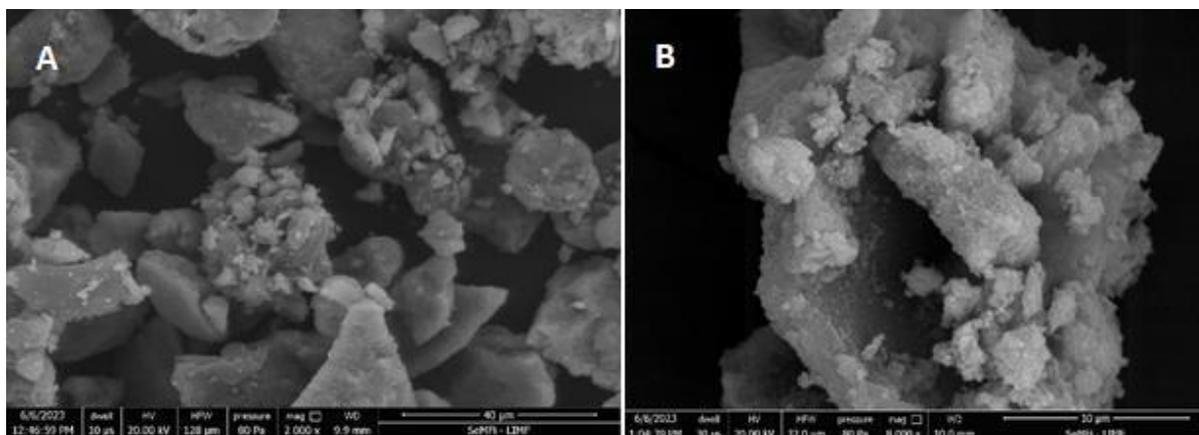
**Tabla 5.7.** Concentración máxima de W que podría encontrarse en el medio de reacción, concentración de W encontrada en el medio de reacción y porcentaje de heteropoliácido lixiviado en transesterificaciones con 0,12 y 0,25% p/p de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en las condiciones óptimas.

Cantidad de catalizador (mg)	Tiempo (h)	Concentración de W (mg L <sup>-1</sup> )		HPA lixiviado (%)
		Máxima (teórica)	Experimental	
25,5	3	308,6	57,7	18,7
24,0	6	290,3	65,8	22,6
25,5	24	308,6	70,3	22,7
49,6	3	600,0	146,9	24,6

Los resultados evidenciaron que entre un 18,7 y un 24,7 % del heteropoliácido se desorbe del soporte independientemente del tiempo de reacción. Esta pérdida de HPA del catalizador podría explicar la disminución en la conversión y rendimiento luego de un primer uso del catalizador en la transesterificación de aceite usado, donde el material activo presenta una carga de HPA muy por encima de la cobertura de la monocapa.

La Figura 5.8 muestra las imágenes captadas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> luego de tres ciclos de reuso en la

transesterificación de aceite usado con metanol en las condiciones descritas anteriormente.



**Figura 5.8.** Imágenes de 42% HPA/TiO<sub>2</sub> luego de tres ciclos de reuso en la transesterificación de aceite usado en cocción con metanol a 60°C obtenidos mediante Microscopía Electrónica de Barrido con magnificaciones 2000× (A) y 8000× (B).

Al comparar estas imágenes con las del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> sin utilizar (ver Figura 5.3), se observa que no hay modificaciones significativas en la textura superficial del catalizador luego de cuatro ciclos de uso.

## 5.5 CONCLUSIONES

Esta investigación demuestra que el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson H<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>·28,5 H<sub>2</sub>O presenta una mayor actividad que sus sales de níquel y manganeso en la esterificación de ácido oleico. Por otro lado, se encontró que al soportarlo en un 42% p/p sobre dióxido de titanio presenta una actividad similar al HPA másico, incluso usando una menor cantidad de alcohol y tiempo de reacción. La evidencia indicó que la presencia de sitios ácidos de tipo Brønsted, así como también la formación de cristales de HPA, los cuales conducen a una catálisis de tipo pseudolíquida, son fundamentales para un buen rendimiento catalítico.

Se observó una conversión del 75% al usar un 0,25% p/p del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la transesterificación de aceite usado con metanol a 60°C durante 3 horas. Este catalizador se reutilizó 3 veces con una baja disminución en su actividad catalítica.

Además, la textura superficial del 42% HPA/TiO<sub>2</sub> no se alteró en la reacción, a pesar de que se encontró una cierta lixiviación del heteropoliácido en los medios de reacción.

## 5.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gambaro, L. A. & Briand, L. E. (2004). In situ quantification of the active acid sites of H<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>.xH<sub>2</sub>O heteropoly-acid through chemisorption and temperature programmed surface reaction of isopropanol. *Appl. Catal A: Gen.* 264, 151-159.

Matkovic, S. R.; Briand, L. E.; Bañares, M. A. (2011). Investigation of the thermal stability of phosphotungstic Wells-Dawson heteropoly-acid through in situ Raman spectroscopy. *Mater. Res. Bull.* 46, 1946-1948.

Matkovic, S. R.; Collins, S. E.; Bonivardi, A. L.; Bañares, M. A. (2014). Infrared and Raman investigation of supported phosphotungstic Wells-Dawson heteropolyacid. *Curr. Catal.* 3, 199–205.

Matkovic, S. R.; Collins, S. E.; Bonivardi, A. L.; Bañares, M. A.; Briand, L. E. (2015). Molecular structure and thermal stability of the oxide-supported phosphotungstic Wells–Dawson heteropolyacid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 8097.

Matkovic, S. R.; Nilsson, J. F.; Fait, M. E.; Morcelle, S. R.; Briand, L. E. (2016). Screening of novel materials for biodiesel production through the esterification of oleic acid. *Catal. Lett.* 146, 2341-2347.

Matkovic, S. R.; Bosco, M.; Collins, S. E.; Briand, L. E. (2019). Tailored Brønsted and Lewis surface acid sites of phosphotungstic Wells Dawson heteropoly-acid. *Appl. Surf. Sci.* 495, 143565.

Missono, M. (2001). Unique acid catalysis of heteropoly compounds (heteropolyoxometalates) in the solid state. *Chem. Commun.* 13, 1141-1152.

Reinoso, D. M.; Ferreira, M. L.; Tonetto, G. B. (2013). Study of the reaction of mechanism of the transesterification of triglycerides catalyzed with zinc carboxylates. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 377, 29-41.

Sambeth, J. E.; Baronetti, G. T.; Thomas, H. J. (2003). A theoretical–experimental study of Wells–Dawson acid. An explanation of their catalytic activity. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 191, 35-43.

Xiao, G. M. & Gao, L. (2011). First Generation Biodiesel. *Biofuel Production- Recent Developments and Prospects.*

# CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL  
ESTUDIO DE LA  
TRANSESTERIFICACIÓN DE  
ACEITE UTILIZANDO EL  
BIOCATALIZADOR  
EVERSA<sup>®</sup> TRANSFORM

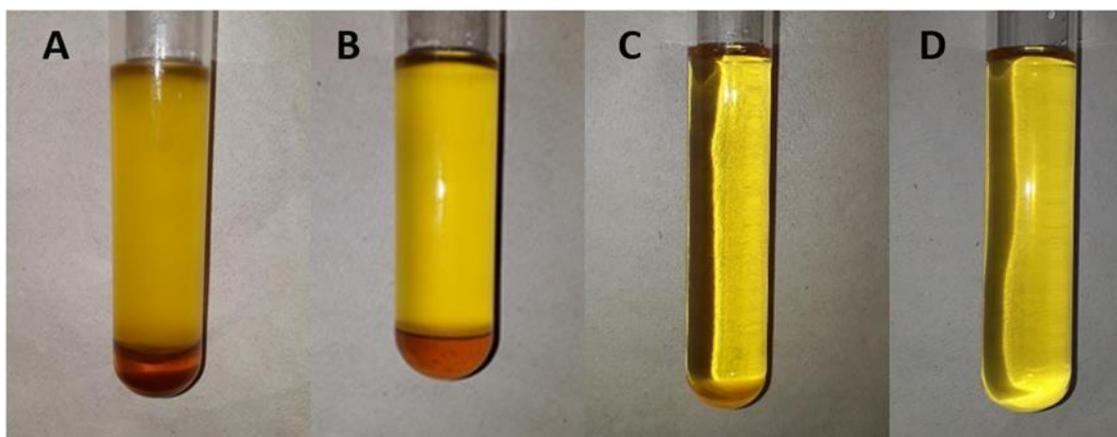
En este capítulo se presenta el estudio, los resultados y la discusión de los mismos, acerca de la reacción de transesterificación de aceite con distintos alcoholes de cadena corta utilizando como como el biocatalizador comercial Eversa® Transform. A partir de la Sección 6.2 se presentan los resultados sobre el estudio de la performance del catalizador en distintas condiciones de reacción. Para esta investigación, como se detalla en el Capítulo 4 Sección 4.2.2, se realizaron reacciones en un sistema batch con aceite fresco, agua y se estudió el efecto de la cantidad de metanol agregado y de la modificación en la cantidad de biocatalizador. Se buscó establecer las condiciones óptimas. Una vez establecidas las mismas se procedió a estudiar el efecto de la naturaleza del alcohol cambiando el metanol por distintos alcoholes. Por otro lado, también se modificó la cantidad de agua agregada al medio de reacción.

Así mismo a fin de establecer la reusabilidad del biocatalizador se investigó la actividad en reuso de la Eversa® Transform en la reacción estudiada.

## **6.1 ANÁLISIS DE LOS MEDIOS DE REACCIÓN**

### **6.1.1 Estudio de las fases de los medios de reacción**

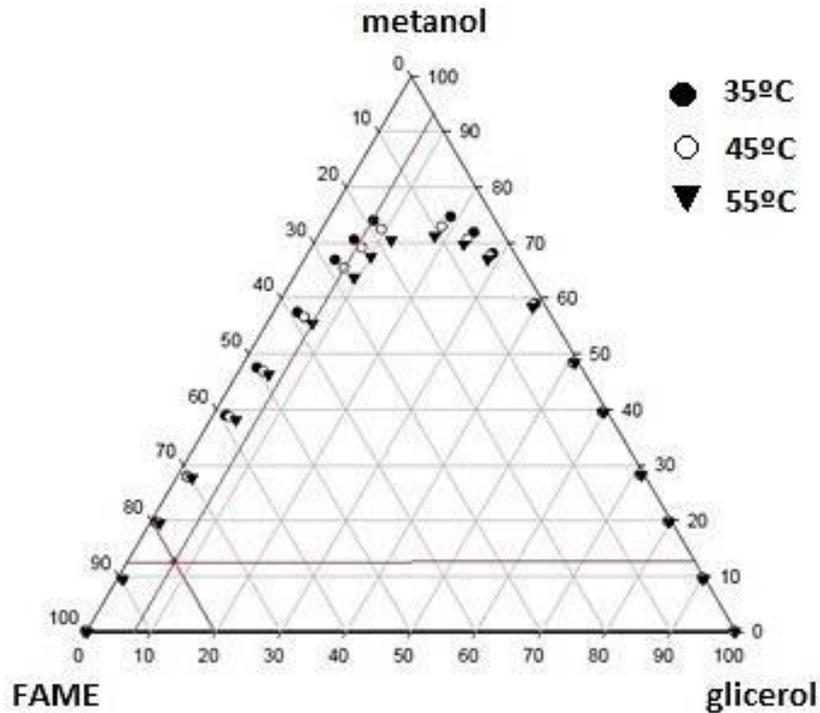
La transesterificación enzimática de aceite con metanol y el biocatalizador comercial Eversa® Transform genera un sistema de tres fases bien definidas. De hecho, esta observación consta en el documento de aplicación de la compañía que comercializa dicha enzima, en el mismo se reporta una fase ligera superior, una fase pesada inferior y una fase media donde se encuentra la enzima (The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook, s.f.). Sin embargo, los diversos ensayos de reacción realizados en la presente investigación demostraron que cuando se utilizan alcoholes distintos al metanol y al etanol, la separación de las fases no está bien definida. En el caso del 1-propanol y 1-butanol (Figura 6.1, C y D) se observa la formación una mezcla homogénea.



**Figura 6.1.** Fases observadas en el medio de reacción de la transesterificación enzimática con metanol (A), etanol (B), 1-propanol (C) y 1-butanol (D).

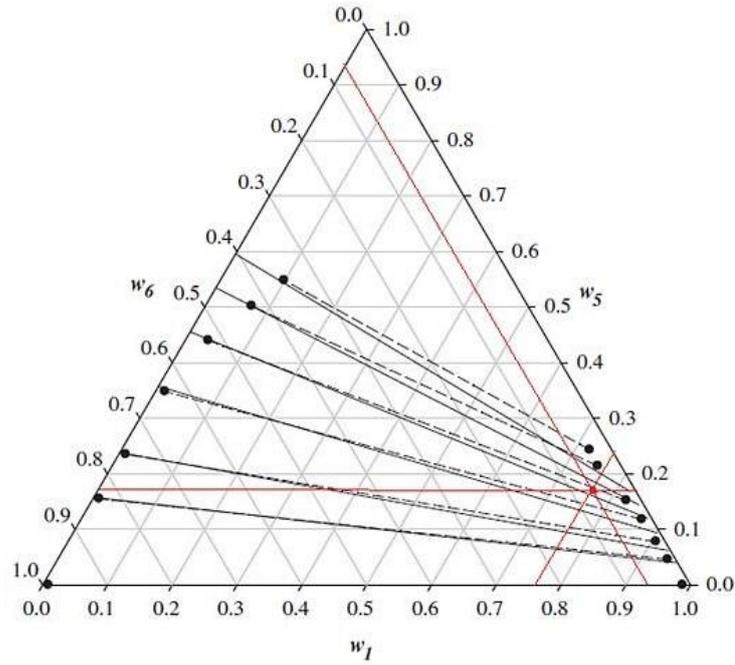
Los diagramas de fases ternarios del glicerol (o agua), los alcoholes y los ésteres de ácidos grasos proporcionan información respecto a las fases de cada mezcla. Los diagramas presentados a continuación indican como será el medio de reacción luego de la transesterificación con metanol (Figura 6.2), etanol (Figura 6.3) y 1-propanol (Figura 6.4) indicando si los medios serán mono- o bifásicos, así como también las fases presentes en la mezcla de reacción inicial de la reacción transesterificación al utilizar 1-butanol (Figura 6.5) (Doungsri & Sookkumnerd, 2011; EL-Hefnawy ME., 2012; Follegatti-Romero et al., 2012; Kayali et al., 2016).

Al realizar la transesterificación de aceite usado en cocción, utilizando las condiciones de relación molar aceite: metanol 1: 6,8; 1% v/p de biocatalizador, por 24 h a 35°C, pudo determinarse que en el sistema de reacción obtenido se encuentra un 7,7 % de glicerol, 80,1% de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y 12,3% de metanol. Esta composición se indica en la Figura 6.2 con un punto rojo en el diagrama de fases de FAME, metanol y glicerol. Se observa entonces que el sistema está localizado dentro de la zona bifásica (área debajo de los símbolos). Estos resultados coinciden con lo observado experimentalmente durante el desarrollo de este estudio.

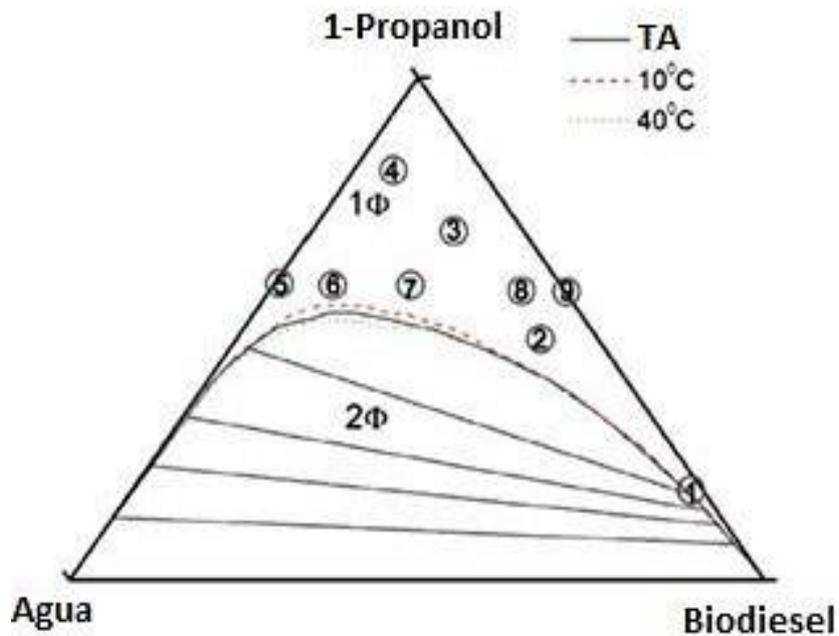


**Figura 6.2.** Diagrama de fases de FAME, metanol y glicerol reportado en la literatura (Doungsri & Sookkumnerd, 2011).

En la Figura 6.3 se presenta el diagrama ternario correspondiente a los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE), etanol y glicerol. El punto rojo indica la composición de la mezcla luego de la transesterificación de aceite usado en cocción con una relación molar aceite: etanol 1: 6,8, 1% v/p de biocatalizador, 24 h de reacción a 35°C. Dicha composición corresponde a 6,2% de glicerol, 75,3% de FAEE y 18,5% de etanol. Nuevamente es de esperar que los productos de la reacción formen un sistema bifásico ya que esta composición se encuentra localizada por debajo de los puntos negros marcados en el diagrama. Se ve claramente que los productos de la transesterificación con metanol y etanol forman dos fases como se observa en las fotografías A y B de la Figura 6.1.



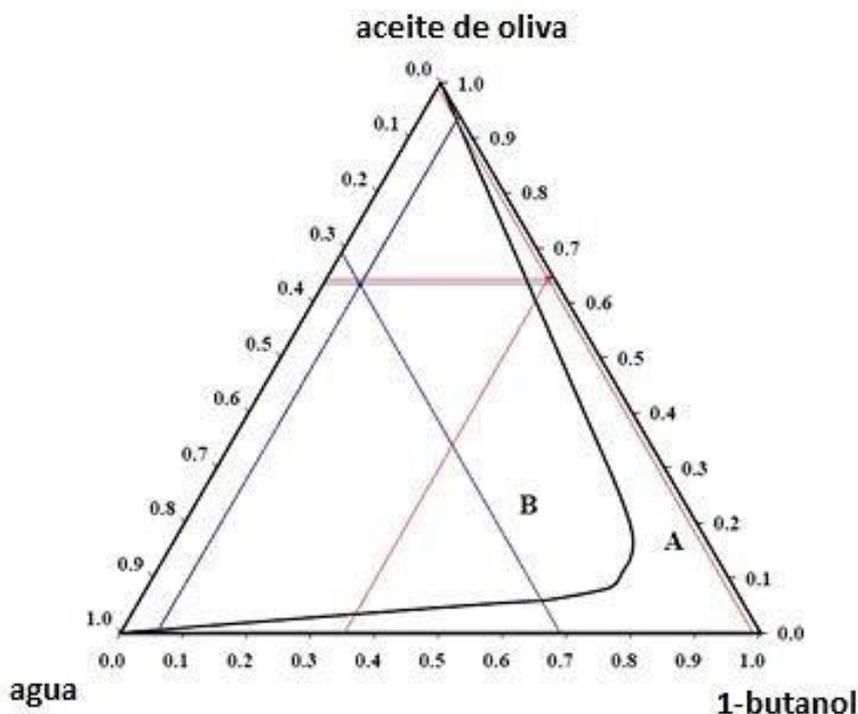
**Figura 6.3.** Diagrama de fases de FAEE (fracción de masa,  $w_1$ ), etanol (fracción de masa,  $w_5$ ) y glicerol (fracción de masa,  $w_6$ ) a 323 K reportado en la literatura (Follegatti-Romero, 2012).



**Figura 6.4.** Diagrama de fase de biodiesel (FAPE), agua y 1-propanol reportado en la literatura (Kayali, 2016).

Sin embargo, en el caso de la composición de los productos de reacción con 1-propanol en la Figura 6.4 se encuentra en el límite superior de la zona bifásica por lo que se espera una interfase poco definida, con una pequeña fase inferior como la que se observa en la Fotografía C de la Figura 6.1. La mezcla obtenida luego de la transesterificación de aceite usado en cocción con una relación molar aceite: 1-propanol 1:6,8; 1% v/p de biocatalizador, por 24 h a 35°C presenta una composición de 1,6% de agua, 78,5% de ésteres propílicos de ácidos grasos y 19,9% de 1-propanol. Si observamos el diagrama de la Figura 6.4, esta composición se encuentra en la zona indicada como "1", la cual se localiza en la interfase entre la zona mono- y bifásica.

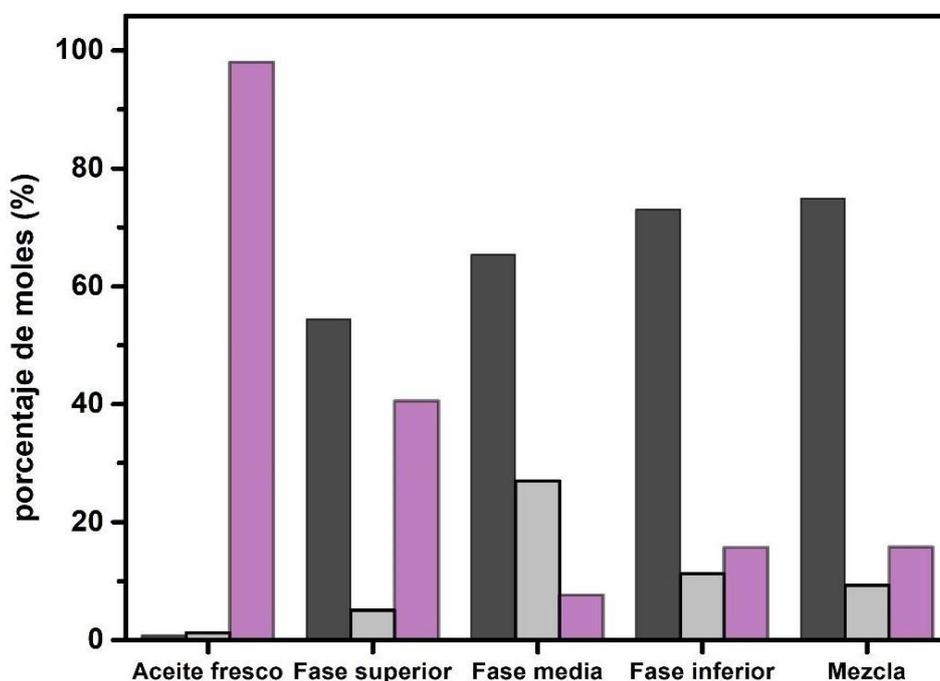
Finalmente, la Figura 6.5 presenta el diagrama de fases de mezclas de aceite, agua y 1-butanol. La mezcla inicial de reacción contiene aceite y 1-butanol con una relación molar 1: 6,8 y 2% v/p de agua presenta una composición de 63,7% de aceite usado en cocción, 1,3% de agua y 35,0% de 1-butanol, la cual se encuentra en la zona denominada A del diagrama, lo que corresponde a un sistema monofásico. Esta información se correlaciona con la ausencia de fases definidas como se observa en la fotografía D de la Figura 6.1.



**Figura 6.5.** Diagrama de fases de aceite de oliva, agua y 1-butanol a 27°C reportado en la literatura (EL-Hefnawy, 2012).

### 6.1.2 Distribución de glicéridos en el sistema trifásico de reacción

En este contexto, surge el interrogante sobre cómo obtener una muestra cuya composición sea representativa de esos sistemas de reacción, considerando que las investigaciones reportadas en la literatura no informan cómo se realizó el muestreo o solo se considera para el análisis la capa superior, la cual generalmente contiene los ésteres de ácidos grasos. Para ello, se tomaron muestras del aceite fresco, de las distintas fases obtenidas luego de la reacción del aceite con metanol y Eversa® Transform, así como también de la mezcla de las tres fases. La mezcla se homogeneizó mediante agitación manual del medio de reacción. Se llevaron a cabo los análisis por cromatografía gaseosa y a partir de las señales correspondientes a mono-, di- y triglicéridos se calcularon los porcentajes de los mismos en cada medio. La Figura 6.6 muestra estos resultados comparando la composición en cada fase, en la mezcla y en el aceite, cabe destacar que las barras grises oscuras corresponden al porcentaje de moles de monoglicéridos, las barras grises claras a diglicéridos, y las barras color magenta a triglicéridos.



**Figura 6.6.** Porcentaje de moles de monoglicéridos (barras grises oscuras), diglicéridos (barras grises claros), triglicéridos (barras color magenta) en aceite de girasol fresco, en las fases superior, media e inferior y la mezcla del medio de reacción luego de la transesterificación con aceite de girasol y metanol catalizada con Eversa® Transform

Como se puede observar en el gráfico, el aceite fresco está compuesto por aproximadamente un 97% de triglicéridos, 2% de diglicéridos y 1% de monoglicéridos. Luego de la reacción, se observa una cierta distribución de los glicéridos en las tres capas, lo que indica que el análisis de sólo una de ellas (la capa superior es la que habitualmente se ensaya) conduciría a una cuantificación errónea de mono-, di- y triglicéridos.

Estos resultados permitieron concluir que el muestreo más representativo proviene de la mezcla homogénea de las fases que comprenden el medio de reacción. Esta práctica fue la que se utilizó a lo largo de la investigación con el biocatalizador Eversa® Transform.

## **6.2 ESTUDIO DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN USANDO EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM**

Como se describe en el Capítulo 1 de esta Tesis, se tiene conocimiento que el biocatalizador comercial Eversa® Transform es capaz de catalizar las reacciones de transesterificación de glicéridos y esterificación de ácidos grasos libres. Incluso la empresa que lo comercializa consta de un manual que indica algunas condiciones operativas para llevar a cabo estas reacciones. Sin embargo, estas condiciones pueden ser optimizadas, como se presenta a continuación.

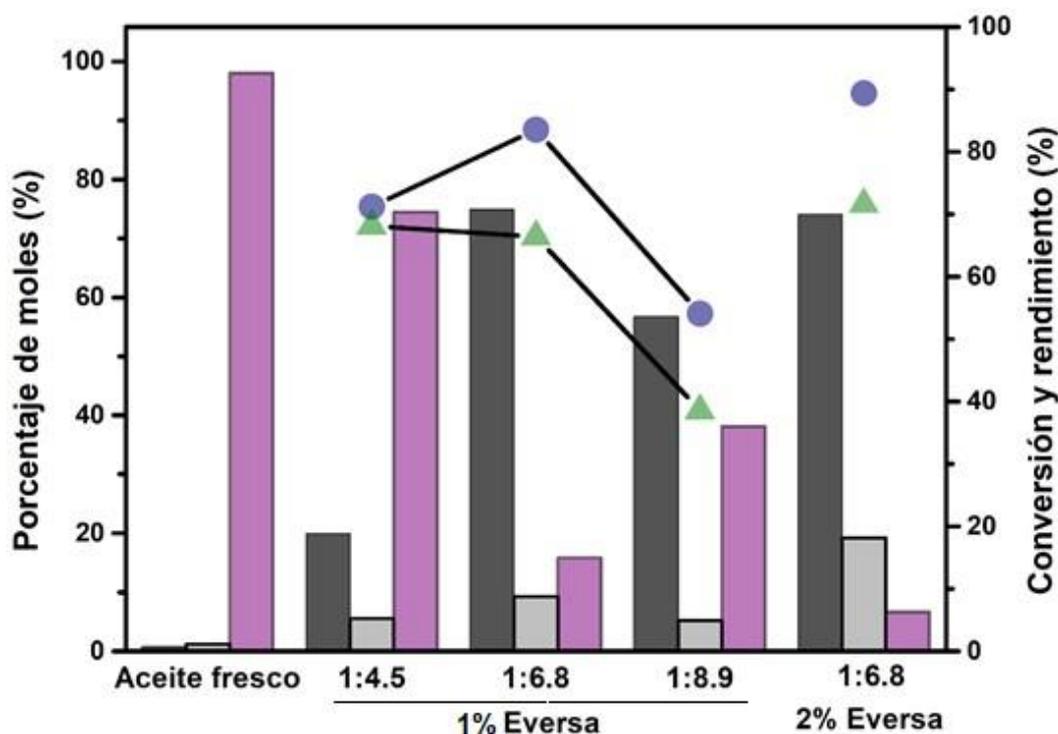
### **6.2.1 Efecto de la relación molar aceite: alcohol y de la cantidad de biocatalizador**

Se investigó el efecto de la cantidad de metanol en el desempeño catalítico de Eversa® Transform y la cantidad de biocatalizador en la conversión de aceite de girasol.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la cantidad de alcohol y de biocatalizador en la transesterificación usando aceite de girasol fresco. Los ensayos se realizaron a la temperatura de 35°C, tiempo de reacción de 24 h y adición de agua recomendados por el proveedor del biocatalizador (The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook, s.f.).

Para estudiar la cantidad de alcohol óptima, se tuvo en cuenta las recomendaciones de la empresa Novozymes que sugiere utilizar 1,5 equivalentes molares de metanol respecto a la cantidad total de ácidos grasos presentes en el aceite. Según los estudios

realizados, los cuales se detallan en el Anexo 4, los triglicéridos que componen el aceite de girasol producido en Argentina están compuestos principalmente por ácido linoleico, oleico, esteárico y palmítico y posee una masa molar igual 876 g/mol. A partir de esta información se calculó que cada 100 g de aceite, los cuales corresponden a 0,11 moles y poseen 0,33 moles de ácidos grasos, se requieren 0,49 moles de metanol (20,0 mL) para cumplir con la relación molar recomendada. En este contexto, se ensayaron las reacciones con las relaciones molares aceite: metanol de 1:4,5 (20 %v/p); 1: 6,8 (30 %v/p) y 1:8,9 (40 %v/p) y 1 %v/p de biocatalizador, cuyos resultados son presentados en la Figura 6.7. Este gráfico muestra el porcentaje de conversión de glicéridos y rendimiento hacia los ésteres metílicos de ácidos grasos. Así mismo, se presentan los porcentajes en moles de mono-, di- y triglicéridos antes y después de la transesterificación del aceite de girasol fresco con las cantidades de alcohol mencionadas anteriormente.



**Figura 6.7.** Conversión de glicéridos (●), rendimiento a ésteres metílicos de ácidos grasos (▲) y porcentajes de monoglicéridos (barra gris oscuro), diglicéridos (barra gris claro) y triglicéridos (barra magenta) de aceite de girasol fresco antes y después de la transesterificación con diferentes relaciones molares aceite: metanol a 35°C por 24 h con 1% v/p de Eversa® Transform y 2% v/p de agua agregada.

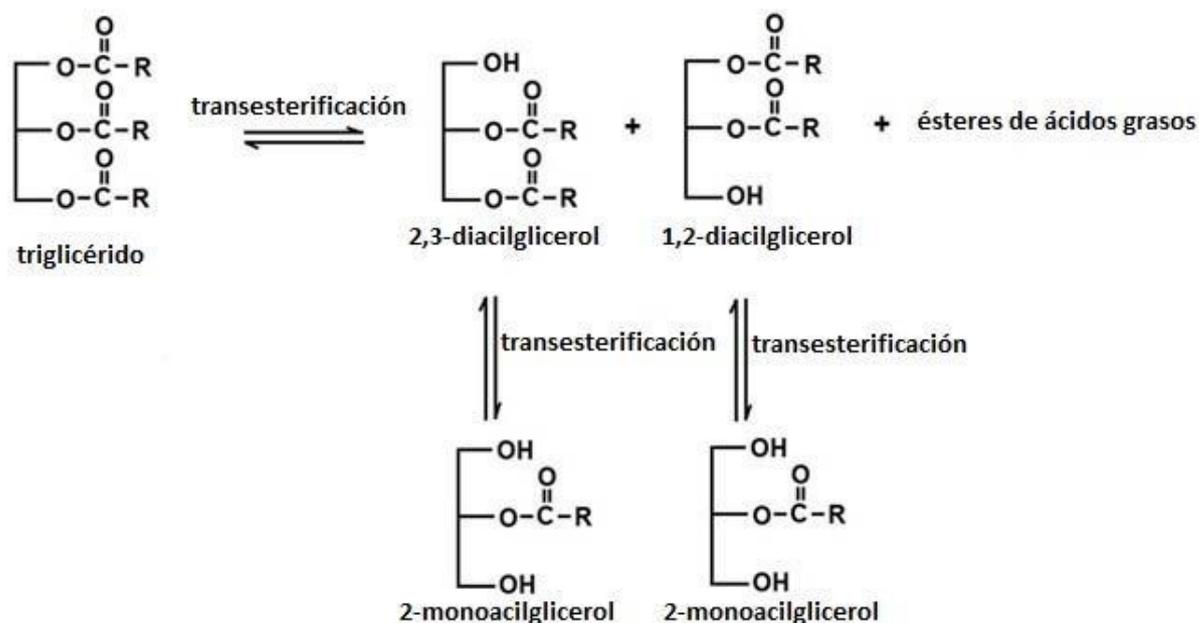
Como se muestra en este gráfico, un incremento en la cantidad de alcohol de 20% a 30% v/p conduce al aumento de la conversión de glicéridos y el rendimiento a ésteres, lo cual podría deberse al desplazamiento del equilibrio. Sin embargo, el rendimiento de la lipasa disminuye cuando el incremento en la cantidad de alcohol es de 40% v/p, como se ve en la Figura 6.7.

Una investigación previa indicó que la cantidad óptima de metanol en la producción de biodiesel a partir de aceite de maíz y catalizada con *Thermomyces lanuginosus* corresponde a 3,8 equivalentes molares de alcohol (Wang et al., 2008). De manera similar, Andrade y colaboradores informaron una relación molar aceite: metanol óptima de 1:6 para la transesterificación de aceite de ricino con Eversa® Transform (Andrade et al., 2017).

Adicionalmente, se investigó la cantidad de catalizador óptima duplicando la cantidad de enzima utilizada (1 a 2% v/p) usando la relación molar óptima encontrada anteriormente (1:6,8). Al aumentar la cantidad de Eversa® Transform no se obtuvo un aumento significativo de la conversión y el rendimiento, esto se debe a la aglomeración de la proteína con altas cargas enzimáticas. Las simulaciones de dinámica molecular evidencian que los residuos polares ingresan al interior de la enzima y que las interacciones del enlace de hidrógeno entre Asp<sup>201</sup> y His<sup>258</sup> en el sitio activo son impedidas en presencia de metanol (Tong et al., 2015). Por otro lado, la investigación reportada por Gonçalves et al. demostró la dimerización de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* en solución acuosa encontrando una mezcla de 43% monómeros y 57% dímeros (~50 kDa) de forma globular a una concentración de 2,7 mg mL<sup>-1</sup> (Gonçalves et al., 2014). En otro estudio, investigadores reportaron que la relación monómero/dímero depende de la concentración de proteínas, con un 38% de los monómeros y 61% de dímeros para 5,4 mg mL<sup>-1</sup>. La asociación de la lipasa en una conformación dimérica influye en la exposición de los sitios activos y es perjudicial para la actividad de la enzima (Palomo et al., 2003). En esta investigación, el agregado de 2% v/p de biocatalizador, implica la adición de 2,00 mL de la formulación líquida correspondiente a 55 mg de proteína, 2,00 mL de agua y 5,00 mL de metanol. En este contexto, la fase inferior (acuosa) del sistema bifásico de reacción contiene aproximadamente 6,11 mg de

proteína por mL, es decir, dentro del rango de concentración del predominio de especies diméricas de la lipasa.

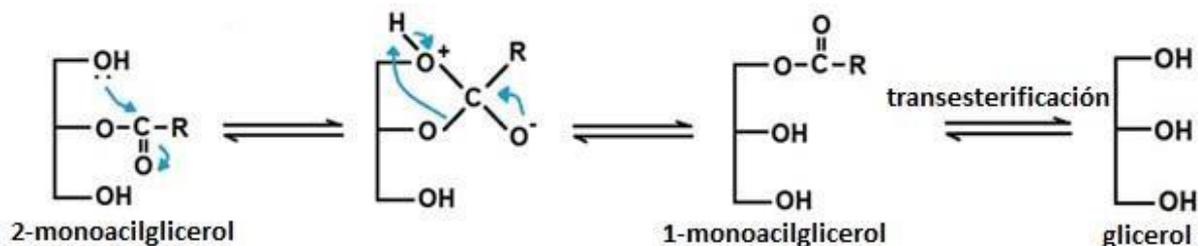
El porcentaje en moles de los triglicéridos presentes en el aceite fresco es del 97% (ver barras color magenta). Sin embargo, luego de la reacción con Eversa® Transform este porcentaje disminuye y aumenta notablemente el porcentaje de monoglicéridos y en menor medida la cantidad de diglicéridos (barras gris oscuro y claro, respectivamente). El aumento en la cantidad de monoglicéridos tras la reacción, es una evidencia de la regioespecificidad de la lipasa que hidroliza los ácidos grasos unidos a las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos como se muestra en el Esquema 6.1 (Monteiro et al., 2021). Esto se debe a que este biocatalizador comercial está compuesto por *Thermomyces lanuginosus* que es una lipasa sn-1,3 típica.



**Esquema 6.1.** Mecanismo de reacción de la transesterificación de aceite usando una lipasa como catalizador.

Asimismo, se produce la migración de acilo que convierte espontáneamente los 2-monoglicéridos y 1,2-diglicéridos, en glicéridos sustituidos en las posiciones 1 y 3. Estudios previos muestran que las lipasas *Thermomyces lanuginosus* y ASL catalizan la ruptura de enlaces de las posiciones sn-1 y sn-3 de los glicéridos y, después de una migración de acilo desde la posición sn-2 a la sn-1 o sn-3, la lipasa vuelve a catalizar la

transesterificación del glicérido formado (Sánchez et al., 2016; Sánchez, et al., 2019; Zhou et al., 2021), como se puede ver en el Esquema 6.2.



**Esquema 6.2.** Mecanismo de migración de acilos

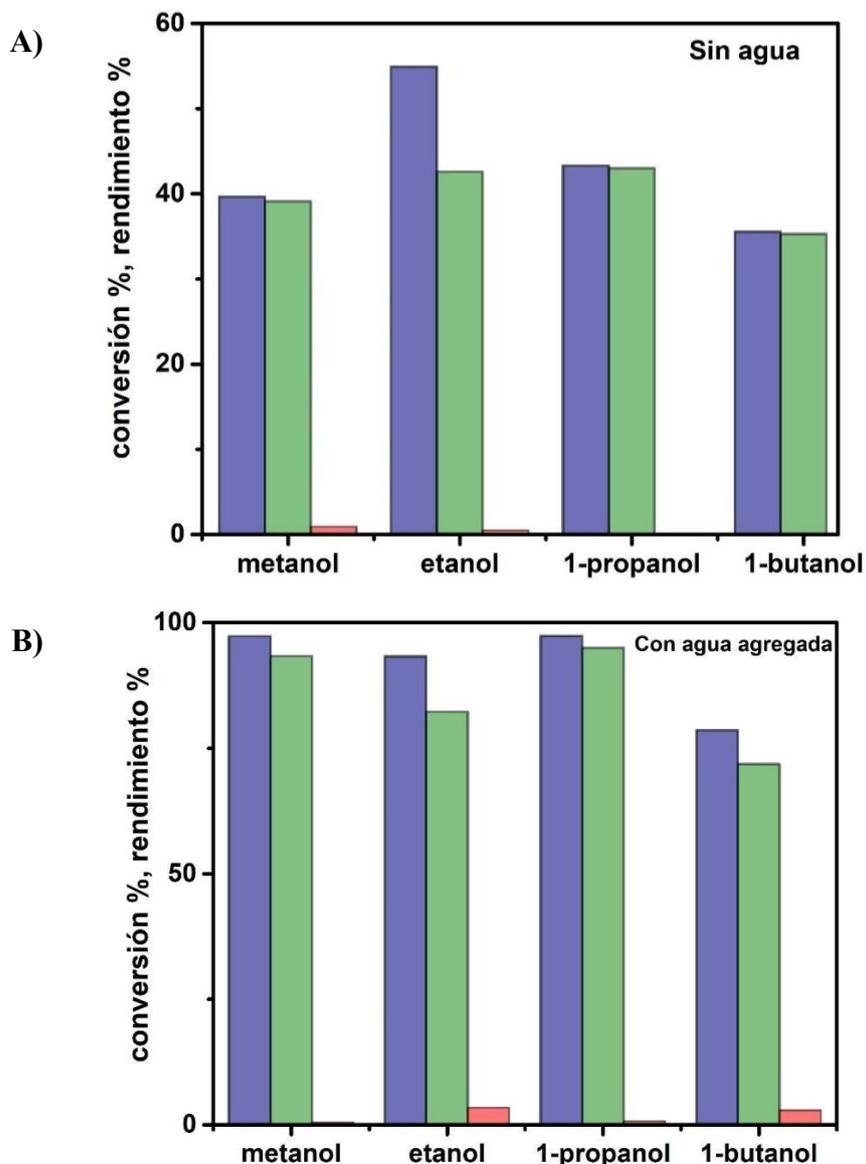
Como se observa en este esquema, el primer paso del mecanismo involucra el ataque nucleofílico de un par de electrones libres del hidroxilo (ya sea en sn-1 o sn-3) al carbono del carbonilo. Luego, se forma un intermedio inestable de cinco átomos y el enlace carbono-oxígeno del éster finalmente se rompe permitiendo la migración de acilo (Pilarek & Szewczyk, 2007; Sánchez et al., 2016; Yang et al., 2005). La transesterificación enzimática en sn-1 y sn-3 genera 2-monoglicéridos con hidroxilos en carbonos primarios que son nucleófilos particularmente más activos que los secundarios. La migración de acilo permite la continuidad de la transesterificación de los 1-monoglicéridos hacia los ésteres de ácidos grasos y el glicerol como producto final.

La observación de que la conversión alcanza el 88,4% en una relación molar de aceite a metanol de 1:6,8; demuestra claramente que la migración de acilo desplaza el límite teórico superior de conversión del 66,7%.

### 6.2.2 Efecto de la naturaleza del alcohol y del agregado de agua

Una vez determinadas la cantidad de alcohol y catalizador óptimas con aceite de girasol fresco con metanol, las cuales corresponden a una relación molar aceite: alcohol 1:6,8 y 1% v/p de Eversa® Transform, se continuaron los ensayos de transesterificación con aceite de girasol usado en cocción como se detalla en la sección 4.2.2. Se estudió el efecto de la naturaleza del alcohol y de la adición de agua al medio de reacción llevando a cabo reacciones con aceite usado y distintos alcoholes de cadena corta con y sin agregado de agua. Las Figuras 6.8 A y B muestran las conversiones de glicéridos y

rendimientos hacia ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos libres en la transesterificación de aceite usado en cocción con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, con y sin adición de agua.



**Figura 6.8.** Conversión de glicéridos (barra azul), rendimiento a ésteres de ácidos grasos (barra verde) y rendimiento a ácidos grasos libres (barra roja) en la transesterificación de aceite usado en cocción con una relación molar aceite: alcohol 1:6,8; 1 %v/p de Eversa® Transform, por 24 h a 35°C, sin agua agregada (A) y con 2 %v/p de agua agregada (B).

Estos gráficos muestran que la conversión de glicéridos y el rendimiento hacia los ésteres de ácidos grasos aumentan considerablemente con la adición de agua al medio

de reacción en todos los casos estudiados, demostrando que la presencia de agua en el medio de reacción es un factor clave en la conversión de glicéridos independientemente de la naturaleza del alcohol. Esta observación se atribuye a que la migración de acilos del 1,2-diacilglicerol y del 2-monoglicerol se ve beneficiada por la presencia de agua (Antczak et al., 2009; Li et al., 2010).

El medio acuoso conduce a la hidrólisis de los enlaces éster en las posiciones sn-1,3 de los triglicéridos, una característica de las lipasas, como se mencionó previamente (Su et al., 2018). La comparación entre la transesterificación con y sin agua añadida muestra que la hidrólisis aumenta ligeramente el rendimiento hacia ácidos grasos libres.

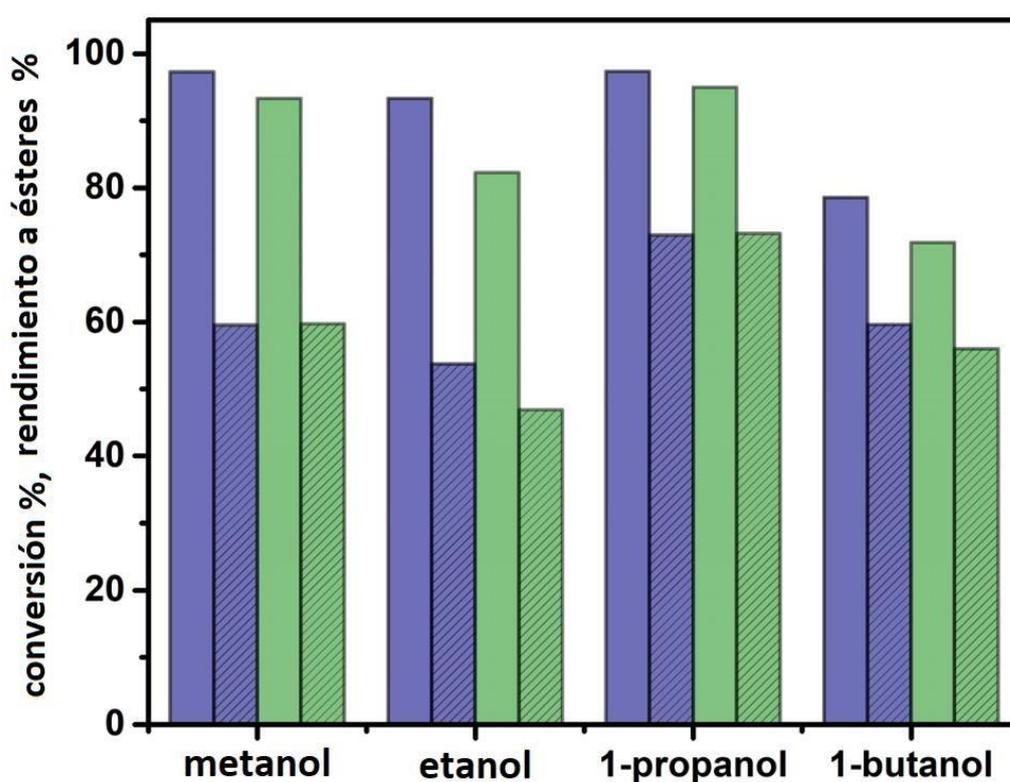
El agregado de 2% v/p de agua en el medio de reacción produce el incremento de rendimiento hacia los ésteres de ácidos grasos para todos los alcoholes ensayados. Es así que el rendimiento se incrementa desde 39% a 93% para el metanol, de 44% a 82% para el etanol, de 43% a 95% para 1-propanol y de 31% a 72% con 1-butanol.

La Figura 6.8 B muestra que la transesterificación con el 1-butanol posee la conversión (78,6%) y rendimiento hacia ésteres butílicos de ácidos grasos (71,8%) más bajos entre los alcoholes estudiados. Este comportamiento se atribuye a la formación de una mezcla homogénea de reacción que se observa claramente en la fotografía D de la Figura 6.1 perteneciente al medio de reacción de la transesterificación con 1-butanol. Una observación similar fue reportada previamente en la transesterificación de aceite de soja con metanol catalizado con *Thermomyces lanuginosus* usando butanol como cosolvente (Zhao et al., 2017). Más recientemente, Hajek y colaboradores también investigaron la transesterificación del aceite de colza en medios de reacción homogéneos de metanol y butanol con un catalizador sólido heterogéneo (Hajek et al., 2020). Este efecto se atribuye a la miscibilidad del 1-butanol con los triglicéridos. En cambio, el metanol y el etanol son inmiscibles con los triglicéridos y por lo tanto forman una mezcla heterogénea de tres fases como se discutió previamente. En estos casos, la lipasa queda situada en la interfase aceite-agua que le provee activación interfacial de los sitios de reacción (Ortiz et al., 2019). Cuando la interfaz es escasa, como en el caso de la reacción con 1-butanol, podría presentarse una baja activación del biocatalizador conduciendo a la disminución de la conversión y rendimiento.

### 6.3 REUSO DEL BIOCATALIZADOR COMERCIAL EVERSA® TRANSFORM

Con el fin de investigar el reuso del biocatalizador se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación de aceite usado en cocción usando los diferentes alcoholes de cadena corta ensayados anteriormente en las condiciones óptimas encontradas y se usaron las fases acuosas procedentes de las reacciones del primer uso del biocatalizador, las cuales contienen a la lipasa.

La Figura 6.9 compara el primer y segundo uso del biocatalizador en la transesterificación de aceite usado con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol.



**Figura 6.9.** Comparación de la conversión (barra azul), rendimiento hacia ésteres de ácidos grasos (barra azul) del primer (barras lisas) y segundo uso (barras con rayas) de la transesterificación de aceite usado en cocción con una relación molar aceite: alcohol 1:6.8 y, solo en el primer uso, 1% v/p de biocatalizador y 2% v/p de agua, 24 h a 35°C.

Los resultados permiten concluir que el biocatalizador mantiene aproximadamente el 60% (76% en el caso del 1-butanol) de su actividad en la conversión de glicéridos y rendimiento hacia los ésteres de ácidos grasos. La disminución de la actividad enzimática

podría atribuirse a la pérdida de enzima durante la recuperación de la fase acuosa después del primer uso.

Por otro lado, en la reutilización del catalizador se encontró que no hay hidrólisis del aceite usado en cocción ya que el rendimiento hacia los ácidos grasos libres es nula.

Un hecho a considerar es que la fase acuosa además de contener la enzima contiene el glicerol producido en la reacción de primer uso del catalizador, además de los 0,37 g de glicerol por litro que se encuentran dentro de la formulación líquida de Eversa<sup>®</sup> Transform. Este exceso de glicerol desplaza el equilibrio de la reacción hacia la formación de los reactivos (Gutiérrez-Lázaro et al., 2018). De hecho, la investigación reportada por Šalic y colaboradores demostró que la separación continua del glicerol aumenta la conversión de aceite usado en cocción hacia FAME utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. En este contexto, un conjunto de dos microrreactores en serie (uno para transesterificación y otro para separación de glicerol) permitió obtener un rendimiento igual al 96% de ésteres metílicos de ácidos grasos en menos de 2 h de reacción frente a 96 h para un reactor discontinuo convencional (Šalic et al., 2018).

#### 6.4 CONCLUSIONES

Se puede concluir que las condiciones óptimas para el biocatalizador comercial Eversa<sup>®</sup> Transform en la transesterificación de aceite usado en cocción corresponden a una relación molar aceite: alcohol de 1:6,8, 2% v/p de agua añadida y 1% v/p de Eversa<sup>®</sup> a 35°C durante 24 h. Se han alcanzado conversiones de hasta el 97% al usar metanol, etanol y 1-propanol como agentes donores de acilos y 78,6% al usar 1-butanol.

Asimismo, se concluyó que la presencia de agua es un factor clave en el rendimiento biocatalítico de Eversa<sup>®</sup> Transform. De hecho, la menor conversión y rendimiento observada en el caso del 1-butanol se atribuyó a la ausencia de la interfaz aceite-agua debido a la miscibilidad de este alcohol con los triglicéridos. Por otro lado, el biocatalizador podría reutilizarse en la transesterificación de aceite usado manteniendo aproximadamente un 60% de actividad, con respecto al primer uso, para el caso de las reacciones con metanol, etanol y 1-propanol y 76% para la reacción con 1-butanol.

## 6.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, T. A.; Errico, M.; Christensen, K. V. (2017). Castor oil transesterification catalyzed by liquid enzymes: feasibility of reuse under various reaction conditions. *Chem Eng Trans.* 57, 913–918.
- Antczak, M. S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process. *Renew Energ.* 34, 1185–1194.
- Doungsri, S. & Sookkumnerd, T. (2011). Solubility curves of FAME+methanol+glycerol. TChE international conference, November, Songkhla, Thailand.
- EL-Hefnawy, M. E. (2012). Water in olive oil surfactantless microemulsions as medium for CdS nanoparticles synthesis. *Mod Appl Sci.* 6, 101–105.
- Follegatti-Romero, L. A.; Oliveira, M. B.; Batista, F. R. M.; Batista, E. A. C.; Coutinho, J. A. P.; Meirelles, A. J. A. (2012). Liquid–liquid equilibria for ternary systems containing ethyl esters, ethanol and glycerol at 323.15 and 353.15 K. *Fuel.* 94, 386–394.
- Gonçalves, K. M.; Barbosa, L. R. S.; Lima, L. M. T. R.; Cortines, J. R.; Kalume, D. E.; Leal, I. C. R.; Mariz e Miranda, L. S.; de Souza, R. O. M.; Cordeiro, Y. (2014). Conformational dissection of *Thermomyces lanuginosus* lipase in solution. *Biophys Chem.* 185, 88-97.
- Gutierrez-Lazaro, A.; Velasco, D.; Boldrini, D. E.; Yustos, P.; Esteban, J.; Ladero, M. (2018). Effect of operating variables and kinetics of the lipase catalyzed transesterification of ethylene carbonate and glycerol. *Fermentation* 4, 75.
- Hajek, M.; Vavra, A.; Mück, J. (2020). Butanol as co-solvent for transesterification of rapeseed oil by methanol under homogeneous and heterogeneous catalyst. *Fuel* 277, 118239.
- Kayali, I.; Jyothi, C. K.; Qamhieh, K.; Olsson, U. (2016). Surfactant-free alternative fuel: phase behavior and diffusion properties. *J Colloid Interf Sci.* 463, 173–179.

- Li, W.; Du, W.; Li, Q.; Sun, T.; Liu, D. (2010). Study on acyl migration kinetics of partial glycerides: dependence on temperature and water activity. *J Mol Catal B: Enzym.* 63, 17–22.
- Monteiro, R. R. C.; Arana-Peña, S.; da Rocha, T. N.; Miranda, L. P.; Berenguer-Murcia, A.; Tardioli, P. W.; dos Santos, J. C. S.; Fernandez-Lafuente, R. (2021). Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renew. Energ.* 164, 1566–1587.
- Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, A.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Cat. Sci. Technol.* 9, 2380–2420.
- Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. (2003). General trend of lipase self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4, 1–6.
- Pilarek, M.; Szewczyk, K. W. (2007). Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *J. Biotechnol.* 127, 736–744.
- Šalić, A.; Tusek, A. J.; Sander, A.; Zelič, B. (2018). Lipase catalyzed biodiesel synthesis with integrated glycerol separation in continuously operated microchips connected in series. *New Biotechnol.* 47, 80–88.
- Sánchez, D.; Tonetto, G. M.; Ferreira, M. L. (2016). An insight on acyl migration in solvent-free ethanolysis of model triglycerides using Novozym 435. *J Biotechnol.* 220, 92–99.
- Sánchez, D.; Tonetto, G. M.; Ferreira, M. L. (2019). Synthesis of acylglycerides with high nutritional value by enzymatic two-step process. *Latin Am. Appl. Res.* 49, 137–142.
- Su, C-H.; Nguyen, H. C.; Nguyen, M. L.; Tran, P. T.; Wang, F-M.; Guan, Y-L. (2018). Liquid lipase-catalyzed hydrolysis of gac oil for fatty acid production: optimization using response surface methodology. *Biotechnol. Prog.* 34, 1129–1136.

- The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook. s.f. [citado el 15 de junio del 2020].  
Disponble en: <https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/food-and-beverage/vegetable-oils-processing/biodiesel>
- Tong, X.; Kamp Busk, P.; Lange, L.; Pang, J. (2015). New insights into the molecular mechanism of methanol-induced inactivation of *Thermomyces lanuginosus* lipase: a molecular dynamics simulation study. *Mol Simulat.* 42, 434–445.
- Yang, T.; Fruekilde, M. B.; Xu, X. (2005). Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chem.* 92, 101–107.
- Zhao, T.; Choi, N.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, H-R.; Kim, I-H. (2017). Lipase-mediated synthesis of fatty acid esters using a blending of alcohol consisting of methanol and 1-butanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 559–565.
- Zhou, Y.; Li, K.; Sun, S. (2021). Simultaneous esterification and transesterification of waste phoenix seed oil with a high free fatty acid content using a free lipase catalyst to prepare biodiesel. *Biomass Bioenergy.* 144, 105930.

## CAPÍTULO 7

ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA  
LIPASA VEGETAL PROVENIENTE  
DE *ARAUJIA SERICIFERA*  
EN LA HIDRÓLISIS,  
ESTERIFICACIÓN Y  
TRANSESTERIFICACIÓN DE  
ACEITE VEGETAL

En este capítulo se presentan los resultados y la discusión correspondientes a los estudios acerca de la actividad catalítica de la lipasa proveniente del látex de la especie vegetal nativa denominada *Araujia sericifera* en la hidrólisis, esterificación y transesterificación de aceite de girasol. Adicionalmente, se presentarán los resultados de la combinación del uso de esta lipasa vegetal y la lipasa fúngica presente en la formulación comercial Eversa® Transform, los resultados individuales del estudio correspondientes a ésta última fueron presentados en el Capítulo 6.

## **7.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA VEGETAL ASL EN LA HIDRÓLISIS DE ACEITE USADO EN COCCIÓN**

En esta sección se presentan y discuten los resultados sobre la investigación de la influencia de la cantidad de lipasa, el agua agregada al medio de reacción, la temperatura y el tiempo de reacción en la actividad hidrolítica de la lipasa vegetal ASL. La metodología, condiciones de operación y los análisis de reactivos y productos utilizados en este estudio, se presentaron en el Capítulo 4, sección 4.2.4.

### **7.1.1 Influencia del agua agregada y la cantidad de biocatalizador**

Se estudió el efecto del agregado de agua y de la cantidad de lipasa de *Araujia sericifera* en la actividad específica en función del tiempo de reacción, a temperatura y agitación constantes. En este contexto, se realizaron ensayos de hidrólisis de 10,0 g de aceite usado a 45°C sin agua y con el agregado de 2,5; 5,0 y 7,5 mL de agua al medio de reacción y 5,0 mg de ASL como biocatalizador. Asimismo, se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis a temperatura constante, con 5,0 mL de agua agregada y 2,5; 5,0 y 7,5 mg de biocatalizador durante 72 h de reacción. El avance de la hidrólisis se determinó a través del índice de acidez en el transcurso de 72 h de reacción.

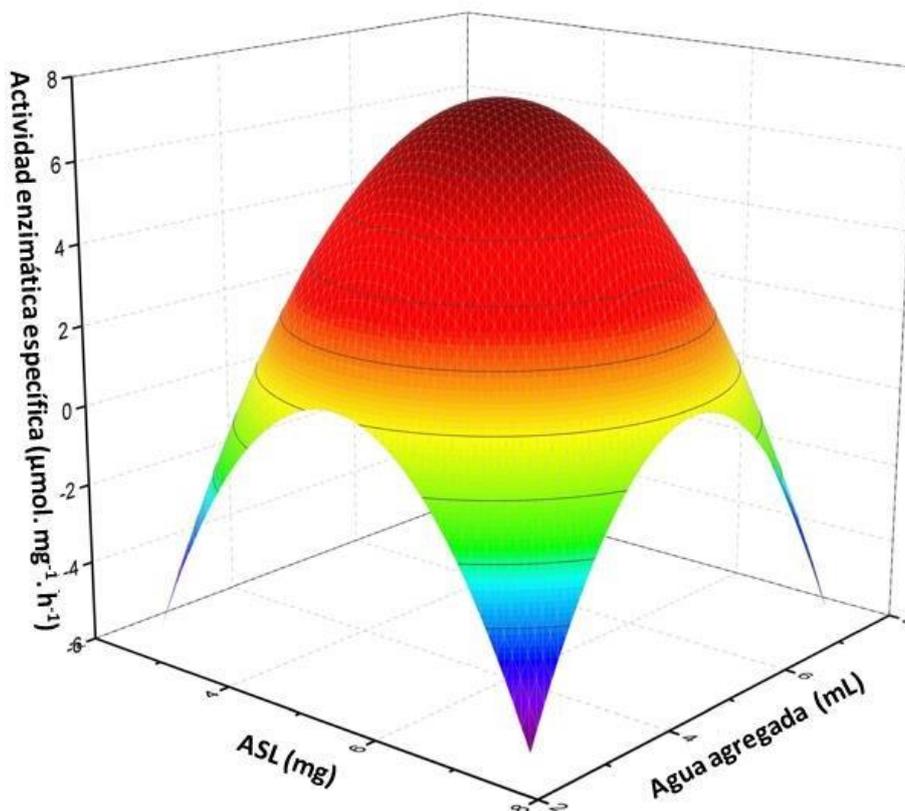
En el Capítulo 4 se describió la metodología de los ensayos y los análisis de reactivos y productos, así como también, el cálculo de la actividad enzimática específica a partir del índice de acidez. En el Anexo 3 se presentan los resultados de actividad enzimática específica de los ensayos nombrados anteriormente. Estos datos se modelaron a través de algoritmos no lineales con el fin de obtener gráficos tridimensionales que permitan establecer las condiciones óptimas de operación en cada caso.

La Ecuación 7.1 representa el modelo cuadrático que mejor ajusta los datos de actividad enzimática específica en función de la cantidad de agua agregada y la masa de biocatalizador ASL, respectivamente.

$$Z = z_0 + A(E - 5)^2 + B(W - 5)^2 \quad (7.1)$$

Donde E es la cantidad de biocatalizador en mg; W es la cantidad de agua agregada al medio de reacción en mL y Z es la actividad en  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Los coeficientes  $z_0$ , A y B corresponden a:  $z_0 = 7,38$ ;  $A = -1,0672$  y  $B = -1,0224$  con un coeficiente de ajuste  $R^2 = 0,99$ .

El gráfico de la Figura 7.1 muestra la dependencia de la actividad específica del catalizador, con la cantidad de agua agregada al medio de reacción y la cantidad de biocatalizador. El mismo muestra que la actividad enzimática específica es óptima en la zona entre 4-6 mL de agua agregada y 4-6 mg de biocatalizador. Asimismo, la actividad enzimática óptima ( $7,4 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) se alcanza en el entorno de los 5,0 mg de ASL y 5,0 mL de agua agregada. El análisis de la superficie generada deja en evidencia que la actividad disminuye drásticamente con el aumento de la cantidad de biocatalizador. Esta observación fue reportada previamente en la esterificación de ácido oleico con la enzima vegetal (Di Santo Meztler et al., 2014; Matkovic et al., 2016; Mateos et al., 2020). La disminución de la actividad catalítica se atribuye a la aglomeración de la enzima que ocurre a altas concentraciones de la lipasa, disminuyendo así la cantidad de sitios activos expuestos y disponibles en la reacción química. La observación de que el rendimiento catalítico de la lipasa mejora al agregar agua al sistema de reacción está relacionado con la activación interfacial de las lipasas. Un sistema orgánico-acuoso proporciona una activación adecuada la cual le permite a las enzimas acceder a los sustratos mediante cambios en la conformación de las mismas a través de modificaciones en los puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals. Este hecho coincide con los estudios realizados por Di Santo Meztler y colaboradores (2014) donde se comprobó que al adicionar un tensioactivo, como el detergente no iónico Triton X, se produce un aumento en la actividad hidrolítica de la lipasa ASL.



**Figura 7.1.** Influencia de la cantidad de biocatalizador ASL y el agua agregada en la actividad enzimática específica de la hidrólisis de 10,0 g de aceite usado en cocción a 45°C y 200 rpm durante 48 horas

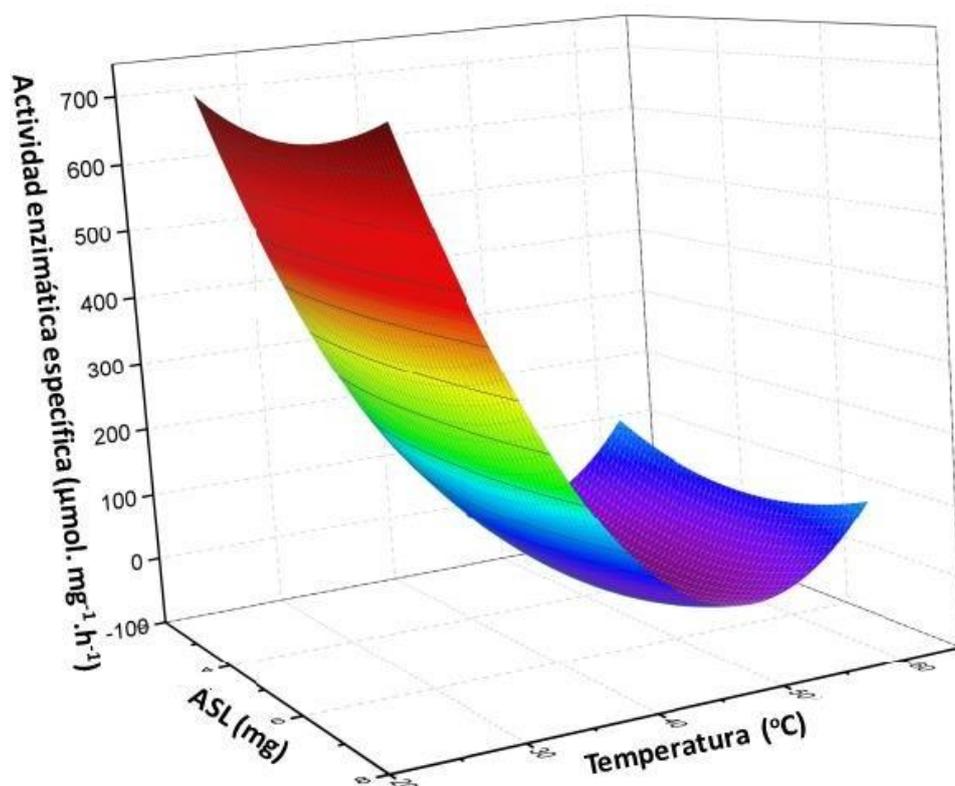
### 7.1.2. Influencia de la cantidad de enzima y la temperatura

Se investigó la influencia de la cantidad de biocatalizador ASL y temperatura en la hidrólisis de 10,0 g de aceite usado en cocción con el agregado de 5,0 mL de agua. Los ensayos se llevaron a cabo con 2,5; 5,0 y 7,5 mg de ASL a 45°C y 200 rpm durante 48 horas. Asimismo, la temperatura fue estudiada realizando ensayos con 10,0 g de aceite usado, 5,0 mL de agua agregada y 5,0 mg de ASL a 200 rpm y durante 30 minutos a 25, 30, 45 y 60°C. Se determinaron los índices de acidez, se calculó la actividad enzimática específica como se describe en el Capítulo 4 y los datos obtenidos se estudiaron mediante algoritmos no lineales. La Ecuación 7.2 representa el modelo que ajusta de manera más adecuada los datos de actividad enzimática calculados:

$$Z = z_0 + A(E - 5)^2 + B(T - 50)^2 \quad (7.2)$$

Donde E es la cantidad de biocatalizador en mg, T es la temperatura y Z es la actividad en  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Los coeficientes  $z_0$ , A y B corresponden a:  $z_0 = -49,89577$ ;  $A = 7,60808$  y  $B = 1,11801$ .

Los resultados indicaron que la mayor actividad enzimática fue a 25°C en todo el rango de cantidad de biocatalizador. En un estudio reportado por Sánchez y col., se informó que la temperatura óptima para la hidrólisis de aceite de soja catalizada con ASL es de 30°C, similar a la temperatura óptima encontrada en esta investigación (Sánchez et al, 2019).



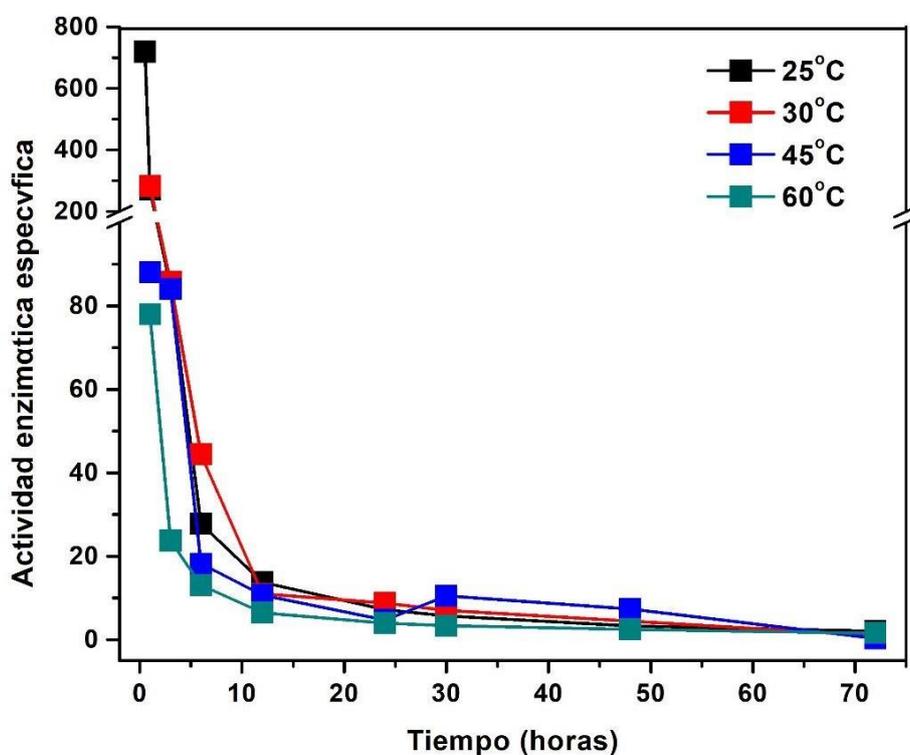
**Figura 7.2.** Influencia de la cantidad de biocatalizador ASL y la temperatura en la actividad enzimática específica de la hidrólisis de 10,0 g de aceite usado en cocción con 5,0 mL de agua agregada a 200 rpm durante 30 minutos.

### 7.1.3 Influencia de la temperatura y el tiempo de reacción

Se investigó el efecto de la temperatura y el tiempo en la reacción de hidrólisis de aceite de girasol usado catalizado con la enzima vegetal ASL. Los ensayos se realizaron

con 10,0 g de aceite usado, 5,0 mL de agua agregada y 5,0 mg de biocatalizador a 25, 30, 45 y 60°C. Los tiempos de reacción estudiados fueron 0,5; 1; 3; 6; 12; 24; 30; 48 y 72 horas como se detalla en el Capítulo 4. Se determinaron los índices de acidez y, a partir de los mismos, la actividad enzimática específica.

En la Figura 7.3 se presenta la actividad enzimática específica en función del tiempo a distintas temperaturas. Los resultados muestran que la actividad enzimática específica máxima (719,05  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) se alcanza en 30 min de reacción a 25°C. La temperatura óptima observada es similar a la encontrada para la reacción de hidrólisis del aceite de soja reportada por Sánchez y colaboradores (2019).



**Figura 7.3.** Actividad enzimática específica de la hidrólisis de 10,0 g de aceite usado en cocción con 5,0 mL de H<sub>2</sub>O; 5,0 mg de ASL y 200 rpm a distintas temperaturas y tiempos de reacción.

#### 7.1.4 Influencia del agregado de un co-solvente orgánico

Finalmente, se investigó la influencia del agregado de n-heptano como co-solvente en la actividad catalítica de la enzima vegetal ASL. En este caso, se ensayó la hidrólisis de aceite de girasol en las condiciones óptimas de reacción, es decir, 10,0 g de aceite; 5,0

mL de agua agregada (correspondiente a una relación molar aceite: agua igual a 1:25); 5,0 mg de biocatalizador, con el agregado de 1,0 mL de n-heptano, durante 30 min de reacción a 25°C. Asimismo, se replicaron los ensayos reportados por Sánchez et al. (2019) en los estudios de hidrólisis de aceite de girasol con la enzima vegetal ASL, a fin de comparar los resultados. En este caso se utilizaron 91,7 mg de aceite, una relación molar aceite: agua igual a 1:9; 1,0 mL de n-heptano durante 5 h de reacción.

La Tabla 7.1 compara las actividades enzimáticas específicas en la hidrólisis de aceite de girasol usado con y sin adición de n-heptano, la actividad obtenida en las mismas condiciones a las reportadas por Sánchez et al. (2019) (ver datos con el superíndice “a” en la tabla) y la actividad enzimática específica reportada por los autores (ver datos con el superíndice “b” en la tabla).

**Tabla 7.1.** Actividad enzimática específica (AEE) de la lipasa ASL en la hidrólisis de aceite de girasol usado con y sin agregado de n-heptano realizado en las condiciones óptimas de la hidrólisis, y con aceite de girasol usado (a) llevada a cabo en las condiciones reportadas en el trabajo realizado por Sánchez y colaboradores con aceite de soja (b) (Sánchez et al., 2019).

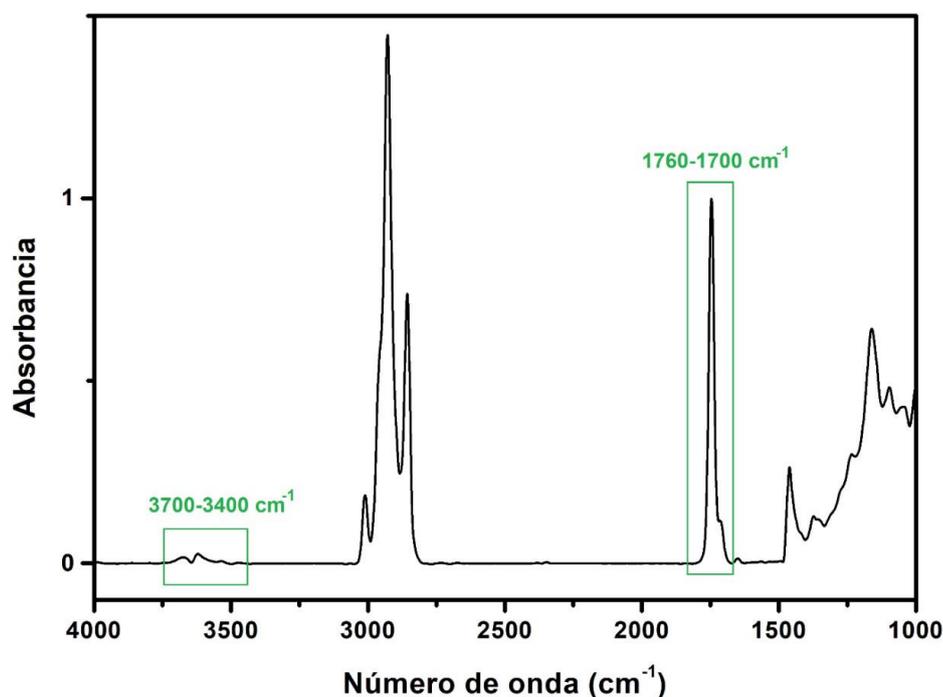
masa ASL (mg)	masa aceite (g)	rel. molar aceite: agua	Volumen heptano (mL)	Tiempo (h)	AEE ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
5,0	10,0	1:25	----	0,5	718,8
5,0	10,0	1:25	1,0	0,5	5,6
<sup>a</sup> 91,7	0,9	1:9	1,0	5	2,4
<sup>b</sup> 87,2	0,9	1:9	1,0	5	4,7

Como se ve en la tabla, la adición de un co-solvente no favoreció el rendimiento catalítico. De hecho, la adición del mismo incluso usando tiempos prolongados de reacción y una cantidad elevada de lipasa ASL (5,0 mg frente a 91,7 mg) disminuyó la actividad enzimática específica dos órdenes de magnitud.

## 7.2. ESTUDIO MOLECULAR DE LA HIDRÓLISIS DE ACEITE USADO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA

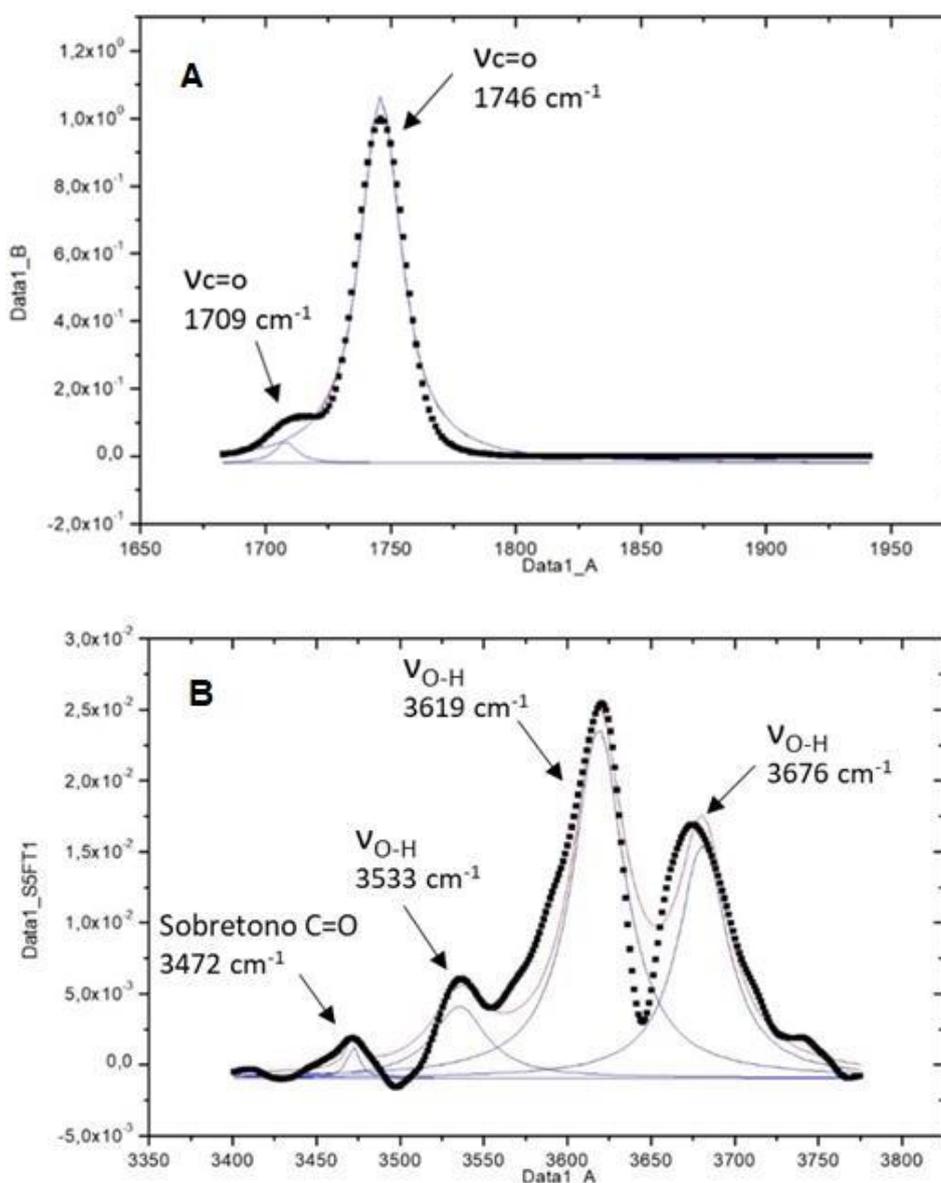
En esta sección se presentan los resultados de la investigación molecular realizada a través del análisis espectroscópico, mediante espectroscopia infrarroja, de las especies químicas generadas en la reacción de hidrólisis enzimática de aceite de cocina usado en cocción. Así como los estudios por cromatografía gaseosa que permitieron estudiar la evolución y cuantificación de los glicéridos presentes. La metodología utilizada fue descrita en el Capítulo 4.

En la Figura 7.4 se presenta el espectro infrarrojo del aceite hidrolizado a temperatura ambiente entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ . En el mismo se observan las señales características del estiramiento del doble enlace del carbonilo C=O en  $1709\text{ cm}^{-1}$  de los ácidos carboxílicos y en  $1746\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los glicéridos. Asimismo, se observa el sobretono del carbonilo C=O que presentan los glicéridos ( $3472\text{ cm}^{-1}$ ), los estiramientos del enlace oxígeno-hidrógeno O-H de los ácidos grasos ( $3533\text{ cm}^{-1}$ ) y los mono- y diglicéridos ( $3676$  y  $3619\text{ cm}^{-1}$ ) (Lafont et al., 2011; Ortiz Tapia et al., 2016; Zhang et al., 2012, Jiang et al., 2016).



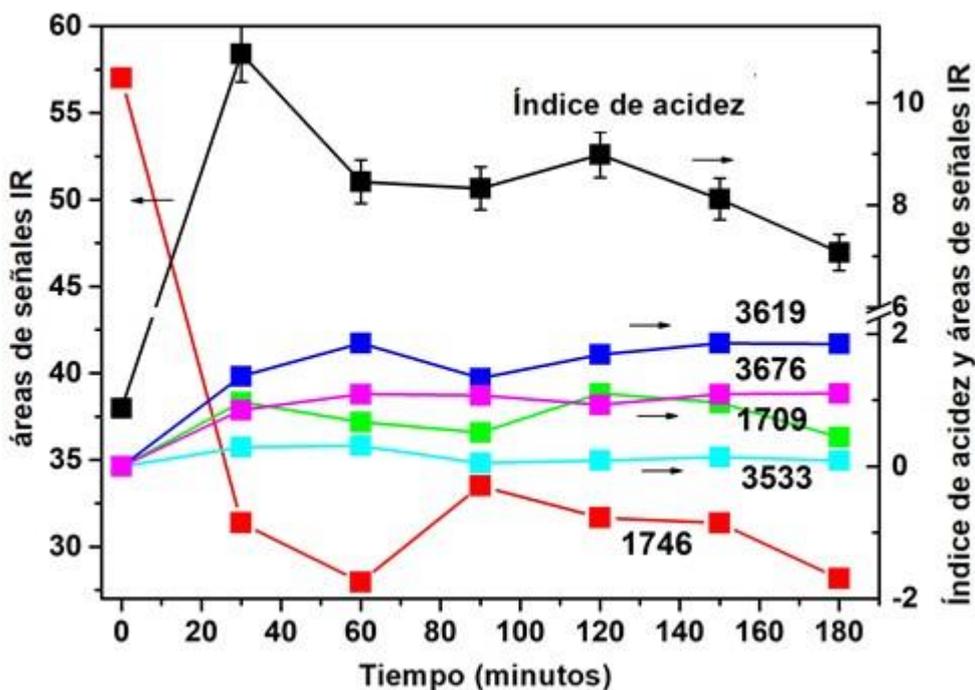
**Figura 7.4.** Espectro FTIR obtenido luego de la hidrólisis de aceite usado en cocción con ASL.

La Figura 7.5 muestra el espectro FTIR correspondiente a una muestra de aceite hidrolizado con ASL, sobre el cual fue realizada la deconvolución de las señales que se encuentran entre  $1760$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Figura 7.5 A) para obtener las áreas correspondientes a las señales que se encuentran centradas en  $1746$  y en  $1709\text{ cm}^{-1}$ . De la misma manera, se llevó a cabo la deconvolución de las señales presentes entre los  $3770$  y  $3400\text{ cm}^{-1}$ , donde se encontraron cuatro señales centradas en  $3472$ ,  $3533$ ,  $3619$  y  $3676\text{ cm}^{-1}$  y se integraron sus áreas (Figura 7.5 B).



**Figura 7.5.** Deconvolución de las señales obtenidas a los  $1709$  y  $1746\text{ cm}^{-1}$  (A) y a los  $3472$ ,  $3533$ ,  $3619$  y  $3676\text{ cm}^{-1}$  (B) en el espectro FTIR del aceite luego de la hidrólisis con ASL.

Por otro lado, en la Figura 7.6 se compara el índice de acidez, determinado sobre muestras tomadas durante la hidrólisis enzimática a distintos tiempos de reacción, con las áreas de las señales infrarrojas correspondientes a los ácidos grasos ( $1709\text{ cm}^{-1}$  y  $3533\text{ cm}^{-1}$ ), a los mono y diglicéridos ( $3472\text{ cm}^{-1}$ ,  $3619\text{ cm}^{-1}$  y  $3676\text{ cm}^{-1}$ ) y los triglicéridos ( $1746\text{ cm}^{-1}$ ) obtenidos de dichas muestras. Puede observarse que la señal correspondiente a los triglicéridos presenta una importante disminución al aumentar el valor del índice de acidez a los 30 min de reacción. Así mismo, se observó un incremento en las áreas de las señales correspondientes a los ácidos grasos y a los mono- y diglicéridos, que luego se mantienen aproximadamente constantes pasados los 30 minutos de reacción. Este comportamiento puede correlacionarse con el tiempo de reacción óptimo antes informado en la sección 7.1.3.

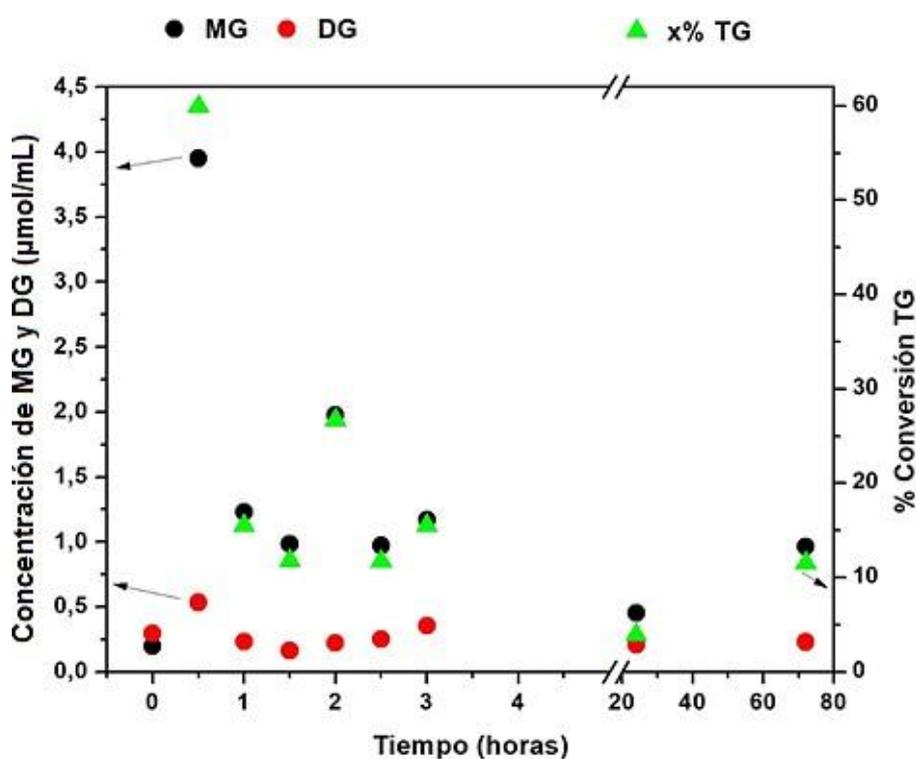


**Figura 7.6.** Índices de acidez y áreas de las señales del espectro FTIR antes y luego de la hidrólisis de 10.0 g de aceite usado con 5,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 mg de ASL, 200 rpm y  $25^\circ\text{C}$ .

La evolución y cuantificación de los glicéridos durante la reacción de hidrólisis, se realizó por cromatografía gaseosa, como se describe en la sección 4.5.2 del Capítulo 4.

A fin de graficar los resultados obtenidos, la concentración de mono, di y triglicéridos fue expresada en  $\mu\text{moles}$  por mililitro y en la Figura 7.7 se muestra la evolución de los

mismos, así como la conversión porcentual de triglicéridos en función del tiempo correspondientes a la reacción de hidrólisis en las condiciones óptimas. Los resultados muestran que los triglicéridos se convierten en un 60% en los primeros 30 minutos de la reacción. La hidrólisis conduce principalmente a la generación de monoglicéridos (3,95  $\mu\text{mol/mL}$ ) y, en menor proporción, a diglicéridos (0,53  $\mu\text{mol/mL}$ ) debido a la regioespecificidad de las lipasas, las cuales hidrolizan los ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos tal como se describe en el Capítulo 6, Sección 6.2.1 (Monteiro et al., 2021).



**Figura 7.7.** Concentración de monoglicéridos (MG) y diglicéridos (DG) antes (tiempo cero de la reacción) y luego de la hidrólisis de 10,0 g de aceite usado en cocción con 5,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 5,0 mg de ASL, 200 rpm y  $25^\circ\text{C}$

### 7.3 ESTUDIO DE LA HIDRO-ESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO EN COCCIÓN CATALIZADA CON LA ENZIMA VEGETAL DE *Araujia Sericifera*

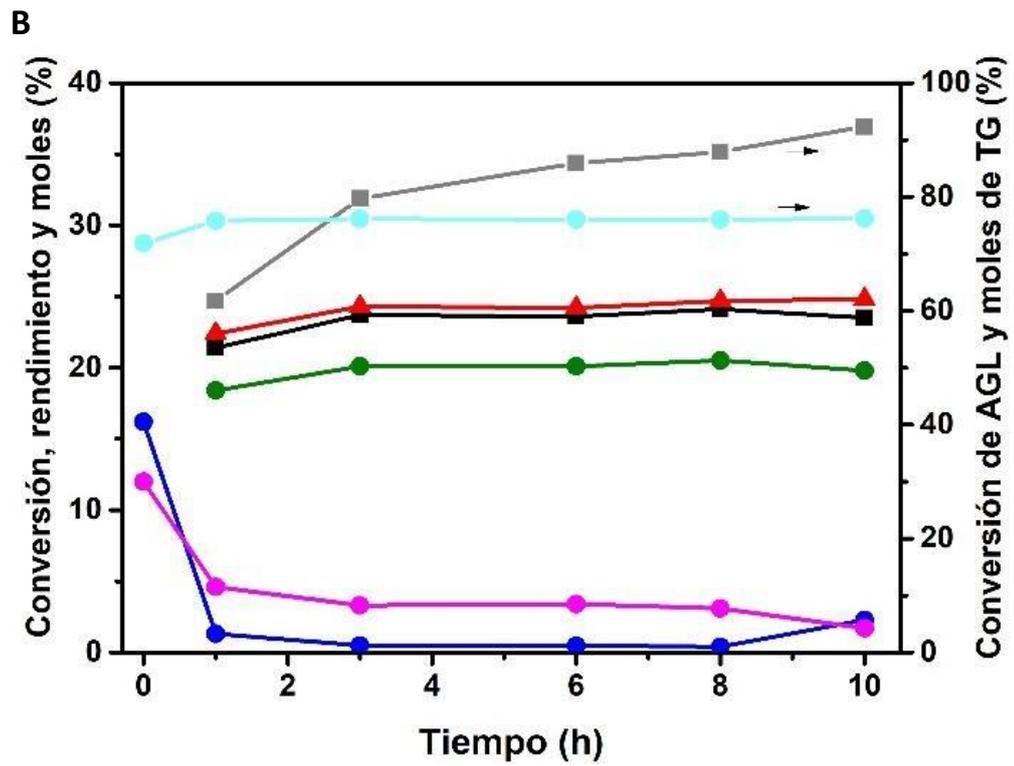
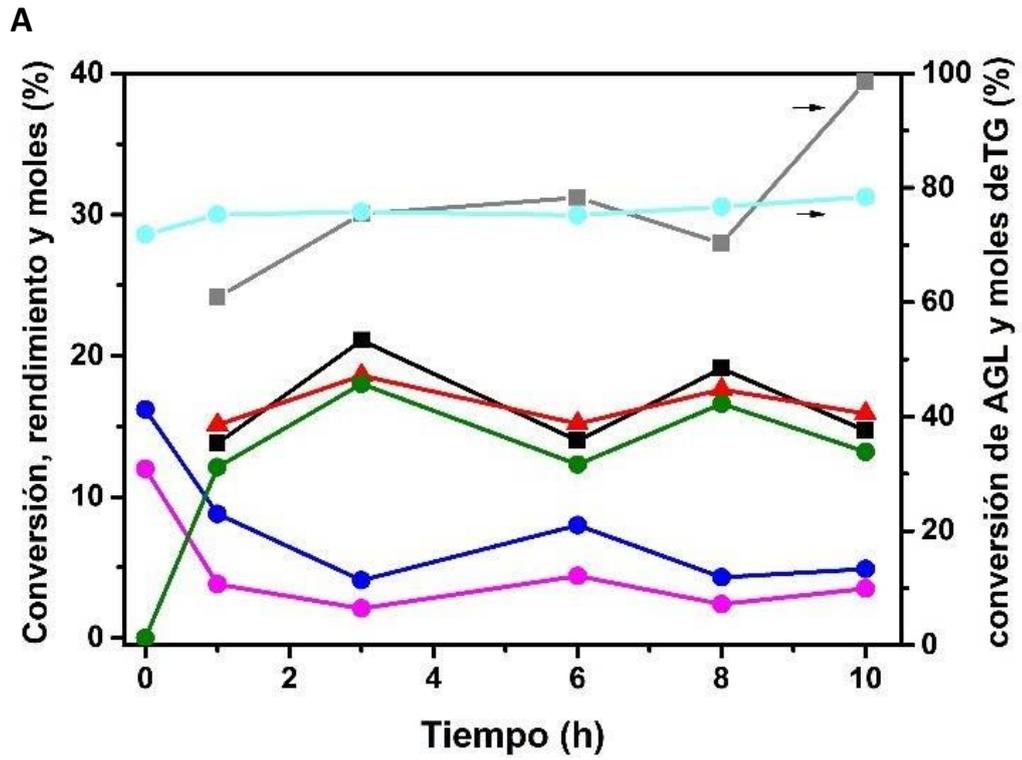
Una vez determinadas las condiciones óptimas para la hidrólisis del aceite usado en cocción se llevó a cabo el estudio de la esterificación enzimática de los ácidos grasos

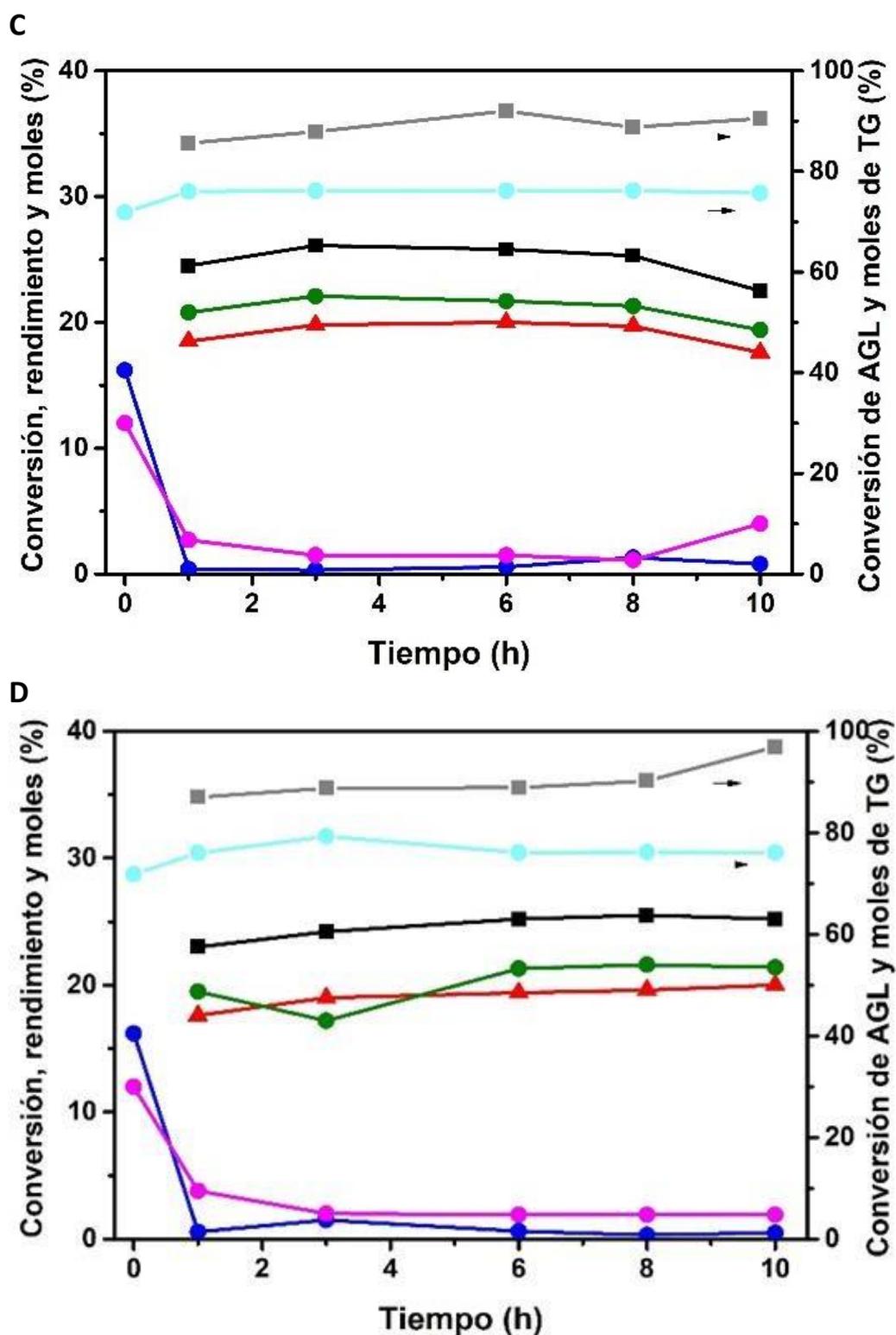
generados a partir del aceite antes hidrolizado en un proceso en cascada denominado hidro-esterificación. En esta sección se presentan los resultados de la investigación sobre la influencia del tiempo de reacción, naturaleza del alcohol y de la presencia de agua en el medio de reacción.

### 7.3.1 Influencia del tiempo de reacción y naturaleza del alcohol

El procedimiento de la hidro-esterificación del aceite usado en cocción se describió en el Capítulo 4. Brevemente, el aceite se hidrolizó durante 30 min a 25°C con 5,0 mL de agua agregada en el medio de reacción y catalizada con 5,0 mg del biocatalizador ASL. Transcurrido ese tiempo, se realizaron experimentos de esterificación con distintos alcoholes, metanol, etanol, 1-propanol o 1-butanol en una relación molar aceite: alcohol igual a 1:0,2 a fin de conocer la actividad que presentaba la enzima en cada sistema de reacción con cada alcohol. Se llevó a cabo la reacción de esterificación de los ácidos grasos libres y la transesterificación de los glicéridos remanentes de la hidrólisis.

En La Figura 7.8 se muestra la conversión de los glicéridos y ácidos grasos libres; el porcentaje de mono-, di-, triglicéridos y glicerol; así como también los rendimientos a ésteres obtenidos en las reacciones con metanol (Figura 7.8 A), etanol (Figura 7.8 B), 1-propanol (Figura 7.8 C) y 1-butanol (Figura 7.8 D) respectivamente. En todos los casos, se observa una elevada conversión a ésteres de los ácidos grasos libres para los cuatro alcoholes ensayados. La misma alcanza entre un 90 y 98% a las 10 horas de reacción. Asimismo, se observa la disminución del porcentaje en moles de los mono- y diglicéridos que son transesterificados a ésteres de ácidos grasos y glicerol. La enzima vegetal de *Araujia sericifera* posee una baja actividad en la conversión de los triglicéridos la misma no supera el 20-25%, esto explica el bajo rendimiento a ésteres en las reacciones de transesterificación de aceite fresco, cuyos valores son menores al 25% con los cuatro alcoholes como se ve en los gráficos de la Figura 7.8.



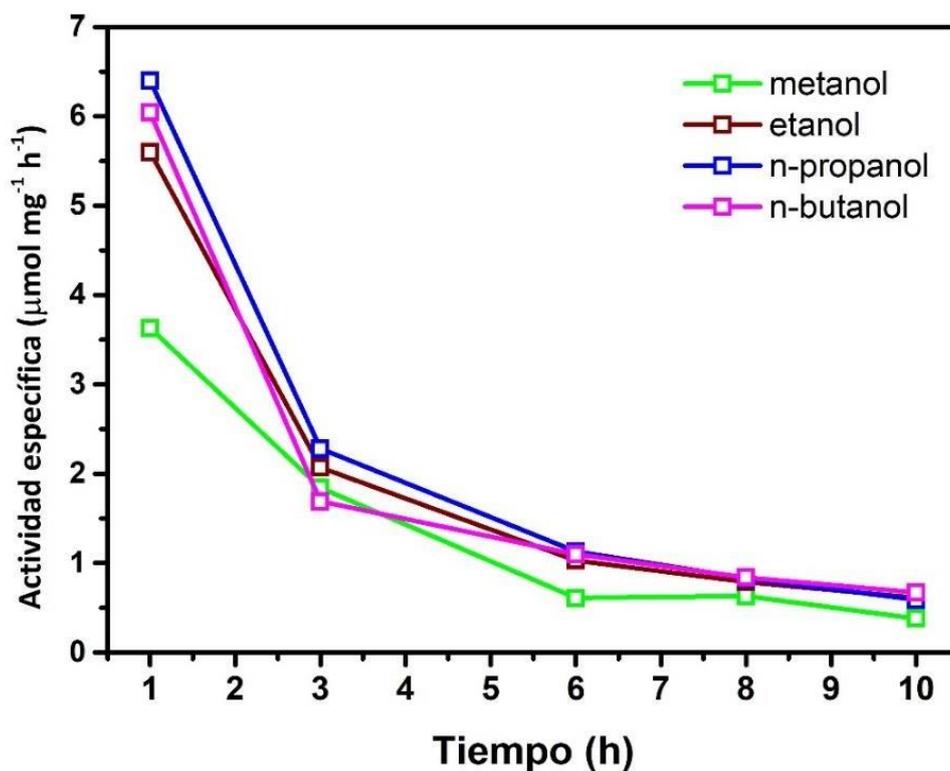


**Figura 7.8.** Conversión de glicéridos (■) y AGL (■), porcentaje de moles de monoglicéridos (●), diglicéridos (●), triglicéridos (●) y glicerol (●), y el rendimiento a ésteres (▲) en la hidro-esterificación de aceite usado con: (A) metanol, (B) etanol, (C) 1-propanol y (D) 1-butanol con una relación molar aceite: alcohol igual a 1: 0,2 a 25°C.

Los resultados muestran que la enzima vegetal de *Araujia sericifera* ASL permanece activa luego de la reacción de hidrólisis y que es capaz de catalizar la esterificación de ácidos grasos sin la necesidad del agregado adicional de biocatalizador.

La Figura 7.9 muestra la actividad enzimática específica del biocatalizador en la esterificación con los cuatro alcoholes estudiados en función del tiempo de reacción. En general, la conversión de ácidos grasos libres aumenta levemente con el tiempo de reacción según se observa en la Figura 7.8. Sin embargo, la actividad específica disminuye abruptamente a las 3 h de reacción independientemente del alcohol utilizado como aceptor de acilo.

Por lo cual, si bien la actividad de la lipasa durante la transesterificación al usar metanol es menor en la primera hora de reacción la actividad enzimática específica evidencia que, posteriormente no está influenciada por la naturaleza del alcohol, tal cual se ve en la Figura 7.9.

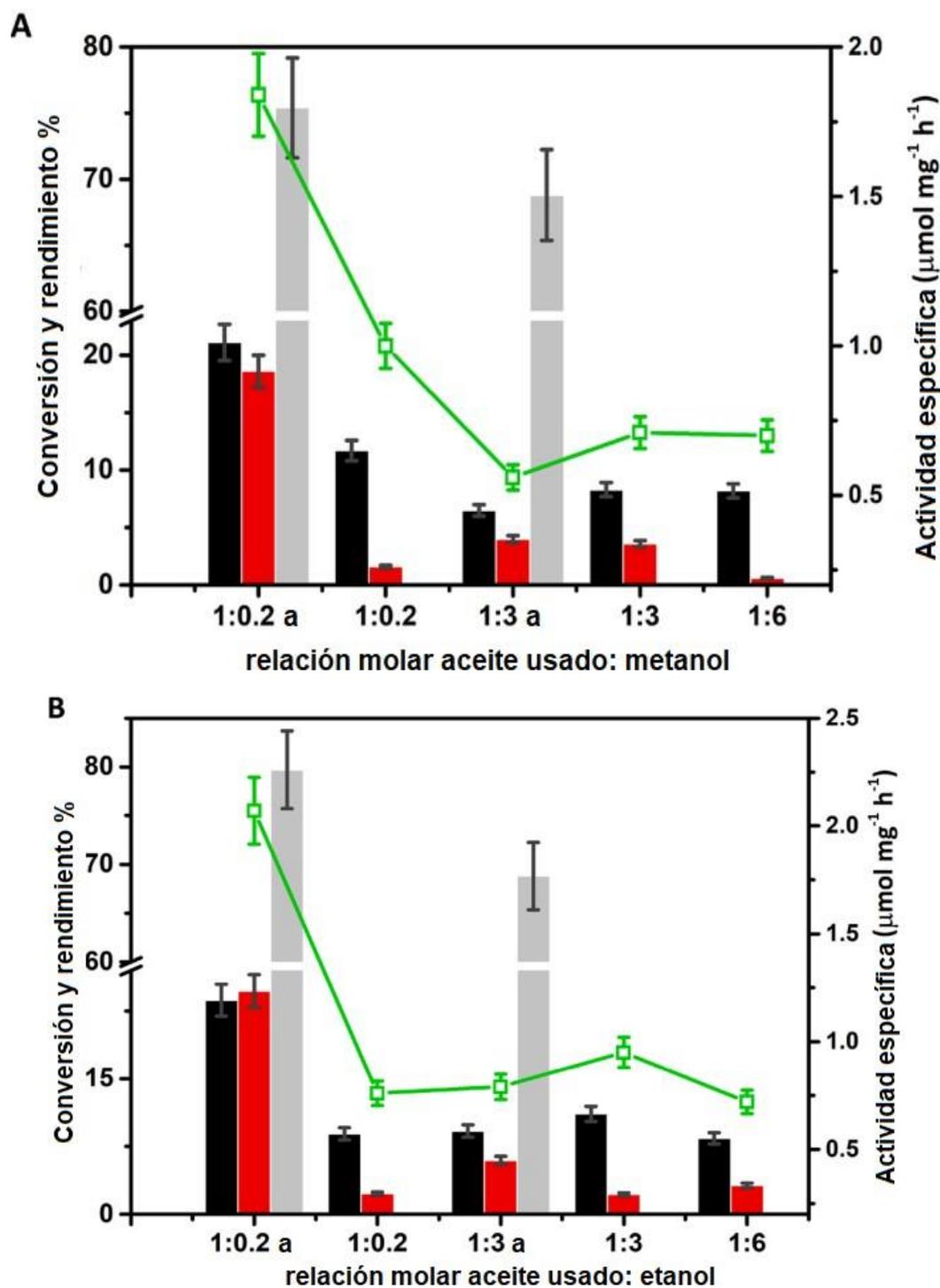


**Figura 7.9.** Actividad enzimática específica de la ASL en la conversión de glicéridos de aceite usado hacia ésteres de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol en función del tiempo de reacción con una relación molar aceite hidrolizado: alcohol de 1:0,2 a 25°C.

### 7.3.2 Efecto de la remoción del agua y cantidad de alcohol

A fin de incrementar la conversión de los glicéridos remanentes luego de la reacción de hidrólisis, se investigó el efecto de la remoción de agua previo a la esterificación, así como también la influencia de la cantidad de alcohol utilizada en la esterificación. De manera de realizar estos estudios, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis en las condiciones óptimas y luego se centrifugó el medio de reacción, se procedió a remover la fase acuosa obtenida y sobre alícuotas del medio oleoso remanente se realizaron distintas reacciones de esterificación usando una relación molar aceite: metanol 1: 0,2; 1:3 y 1:6 respectivamente. En la Figura 7.10 puede observarse la comparación entre los resultados obtenidos y los datos de conversión, rendimiento y actividad enzimática específica calculados para las reacciones de transesterificación donde no se separó la fase acuosa y se estudiaron relaciones molares de aceite: metanol 1: 0,2 y 1:3, como se describe en el Capítulo 4.

Por otro lado, en la Figura 7.10 se muestra la influencia de la presencia de agua en la actividad específica de la enzima vegetal ASL, la conversión de glicéridos y de ácidos grasos libres, el rendimiento a ésteres luego de la esterificación, y al utilizar distintas relaciones molares de aceite usado en cocción y alcohol al utilizarse metanol y etanol, a 25°C y 3 horas de reacción.



**Figura 7.10.** Actividad enzimática específica de la ASL ( $\square$ ), conversión de glicéridos (columna negra), rendimiento hacia ésteres (columna roja) y conversión de ácidos grasos libres (columna gris) para las relaciones molares aceite usado: alcohol de 1:0,2, 1:3 y 1:6 para metanol (A) y etanol (B), sin agua y con agua (indicado con “a”).

La actividad específica de la enzima vegetal ASL, la conversión de glicéridos y ácidos grasos, y el rendimiento a ésteres de ácidos grasos son notablemente mayores en el medio de reacción al cual se le agregó agua y al usar una relación molar aceite: alcohol 1:0,2 si se compara con la misma relación molar en ausencia de la fase acuosa. Este resultado es independiente del alcohol utilizado en la esterificación/ transesterificación del aceite hidrolizado. Puede inferirse que la presencia de agua induce la esterificación de los ácidos grasos. La mayor conversión obtenida en las reacciones en las que no se elimina la fase acuosa luego de la hidrólisis probablemente se deba a que gran parte de la lipasa quede presente en la misma.

Asimismo, al comparar los resultados obtenidos en las reacciones con fase acuosa en la que se utilizaron relaciones molares aceite: alcohol 1:2 a versus 1:3 se observa que el incremento de la cantidad de alcohol no favorece el desplazamiento de la reacción hacia los productos independientemente del alcohol y de la presencia de agua en el medio de reacción. Por otro lado, puede verificarse que una mayor cantidad de alcohol disminuye la performance de la enzima, así como pudo verse en la reacción estudiada con una relación molar aceite: metanol 1:6. La disminución de la actividad enzimática y de la conversión al aumentar la cantidad de alcohol se atribuye a la inhibición de la lipasa ya que los sitios activos de la misma son rodeados por el alcohol impidiendo su actividad (Lima et al., 2015).

#### **7.4 COMPARACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DIRECTA Y LA HIDRO-ESTERIFICACIÓN DE ACEITE USADO**

En la Tabla 7.2 se muestra la actividad enzimática específica, el rendimiento hacia ésteres de ácidos grasos y la conversión de ácidos grasos libres (AGL) en la reacción de transesterificación directa (sin hidrólisis previa) de aceite de girasol fresco y aceite de girasol usado en cocción. Pueden verse las relaciones molares estudiadas de aceite: metanol y de aceite: etanol, siendo las mismas 1:3 y 1:4,5; la temperatura utilizada fue de 45°C y las reacciones fueron llevadas a cabo durante 24 h. Adicionalmente, se presentan los resultados de la hidro-esterificación (con hidrólisis previa) del aceite usado con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, en una relación molar aceite: alcohol igual a 1:0,2; a la temperatura de 25°C y durante 3 h de reacción.

**Tabla 7.2.** Actividad enzimática específica, rendimiento hacia ésteres de ácidos grasos y conversión de ácidos grasos libres (AGL) en la transesterificación directa (sin hidrólisis previa) de aceite de girasol fresco y aceite de girasol usado en cocción con etanol y metanol y en la esterificación/transesterificación con hidrólisis previa.

Aceite	Tratamiento previo	Alcohol	Relación molar aceite: ROH	Temperatura y tiempo	Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Rendimiento ésteres %	Conversión AGL %
Fresco	-----	Metanol	1:4,5	45°C, 24 h	0,04	1,7	-----
	-----	Etanol	1:3		0,03	-----	-----
	-----	Metanol	1:4,5		0,07	2,2	10,3
	-----	Etanol	1:3		0,11	1,6	-----
Usado		Metanol		25°C, 3 h	1,84	17,1	75,4
	hidrólisis	Etanol	1:0,2		2,07	22,7	79,7
		1-propanol			2,28	19,8	87,9
		1-butanol			1,69	19,0	88,8

Al comparar la actividad específica, el rendimiento a ésteres de ácidos grasos y la conversión de ácidos grasos libres de la transesterificación de aceite con y sin hidrólisis previa, se observa un mayor rendimiento catalítico de la enzima vegetal ASL cuando el aceite fue previamente hidrolizado. Estos resultados se condicen con investigaciones previas que se encuentran en la literatura. En este contexto, Vescovi et al. reportaron un método de producción de biodiesel que involucraba la hidrólisis enzimática de aceite de cocina usado catalizada con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* a 30°C, durante 24 h (Vescovi et al., 2016). Luego, el aceite hidrolizado se esterificó con etanol a 40°C usando la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada. La combinación de la actividad hidrolítica y esterásica de ambas lipasas permitió obtener un rendimiento de 92% a ésteres etílicos de ácidos grasos.

Según los resultados preliminares obtenidos en la presente investigación, la lipasa ASL combina ambas actividades probablemente debido a la compleja composición del extracto enzimático no purificado de dicha lipasa vegetal.

### **7.5 REUTILIZACIÓN DE LA LIPASA DEL LÁTEX DE *Araujia sericifera***

En esta sección se presentan los resultados de las investigaciones de reusabilidad de la lipasa vegetal ASL en la reacción de hidrólisis. El proceso de reuso tiene implícito la recuperación del biocatalizador del medio líquido por lo cual, es relevante establecer en qué fase, acuosa u oleosa, se encuentra suspendida la enzima. Según se describió en el Capítulo 4, los ensayos cualitativos se realizaron a través de un sistema bifásico de aceite vegetal y agua, en proporciones similares a las usadas en la reacción, en el que se repartió la lipasa ASL a temperatura ambiente. Luego se separaron las fases y se ensayaron en sendas reacciones de hidrólisis para establecer cuál de ellas, era capaz de catalizar la reacción. En este contexto, se encontró que el índice de acidez de la hidrólisis catalizada con la fase acuosa alcanzó un valor de 10,96 versus 1,49 cuando se utilizó la fase oleosa. Esta observación evidencia claramente que el biocatalizador se reparte preferentemente en la fase acuosa del sistema bifásico. Por lo tanto, los estudios de reutilización de la enzima vegetal se realizaron mediante la recuperación de la fase acuosa y su reuso en sucesivas reacciones de hidrólisis.

En este contexto, se observó que luego de la hidrólisis de aceite de girasol usado en cocción, que fue llevada a cabo en las condiciones óptimas encontradas y con la lipasa del látex proveniente del primer uso de la misma, se obtuvo un índice de acidez de 0,94. Al repetir este procedimiento, el índice de acidez obtenido luego del tercer uso fue igual a 0,45, mostrando que la lipasa ASL no es capaz de ser reutilizada en las condiciones estudiadas.

## **7.6 TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE USADO UTILIZANDO LA COMBINACIÓN DE LIPASAS DE ORIGEN VEGETAL Y FÚNGICO**

En base a resultados obtenidos durante esta Tesis e investigaciones previas reportadas en la literatura, se determinó que la lipasa vegetal ASL presenta actividad catalítica en la hidrólisis y esterificación de aceites vegetales (Matkovic et al., 2016; Sánchez et al., 2019). El látex es considerado un sistema multienzimático, ya que la porción soluble está compuesta por proteasas y la fracción insoluble posee lipasas con actividad hidrolítica, así como se informa la presencia de fosfolipasas (Di Santo Meztler et al., 2014). En particular, la evidencia de la presencia de lipasas en el extracto crudo se ve reflejada en la acción lipolítica que genera la liberación de los ácidos grasos libres en la hidrólisis de los aceites de semilla de algodón y soja, junto con la actividad en la esterificación de los ácidos grasos (Di Santo Meztler et al., 2014; Sánchez et al., 2019).

La lipasa ASL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de aceite usado en cocción hacia monoglicéridos y diglicéridos, y la esterificación de los ácidos grasos libres en un proceso de tipo tándem. Las investigaciones muestran que al utilizar una relación molar aceite: alcohol 1:0,2 y 0,05% p/p de la lipasa a temperatura ambiente se obtiene más del 90% de conversión de los AGL con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol.

Por otro lado, el biocatalizador comercial Eversa® Transform es activo en la transesterificación de aceite usado. Al utilizar metanol, etanol y 1-propanol en condiciones de 35°C, con una relación molar aceite: alcohol 1:6,8; 2% v/p de agua y 1% p/p de Eversa® Transform durante 24 h muestra conversiones y rendimientos a ésteres cercanos al 90%. Al analizar los resultados, se observa que con 1-butanol la conversión y rendimiento a ésteres son menores que con el resto de los alcoholes ensayados, presentando en este caso una conversión del 79% y un rendimiento del 72%.

En este contexto, se realizaron experimentos adicionales combinando las lipasas ASL y Eversa® Transform con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos. En las Tablas 7.3 a 7.6 se muestra el porcentaje en peso de ésteres de ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos, y el índice de acidez obtenidos en la transesterificación con Eversa® Transform, la hidro-esterificación con la lipasa vegetal ASL, la transesterificación con Eversa® Transform seguida de una hidro-esterificación con ASL usando la cantidad de alcohol suficiente para esterificar los ácidos grasos libres y transesterificar los glicéridos remanentes, y en la última columna, los resultados de la hidrólisis con ASL seguida de la transesterificación con Eversa® Transform.

En las Tablas 7.3 a 7.6, puede observarse como en todos los casos, el producto de la hidro-esterificación de aceite usado en cocción catalizada con ASL posee un menor contenido de ésteres de ácidos grasos y una mayor cantidad de triglicéridos, al compararlo con la reacción realizada con la lipasa fúngica. Estos resultados indican que Eversa® Transform es más activa que la lipasa vegetal, no obstante, la reacción con ASL genera un producto con un menor índice de acidez en comparación con Eversa® Transform.

Los ensayos con el biocatalizador comercial y posterior hidro-esterificación con ASL dieron como resultado rendimientos similares que en las reacciones donde se utilizó solamente la lipasa fúngica, con excepción de la reacción con 1-butanol que presentó un aumento significativo en el rendimiento a FAPE.

Finalmente, la hidrólisis con ASL y posterior transesterificación con Eversa® Transform (última columna de las Tablas 7.3 a 7.6), muestra que el porcentaje de ésteres de ácidos grasos obtenido es menor en comparación con la transesterificación únicamente con la lipasa fúngica.

Además, en todos los casos se observa un aumento en el porcentaje de monoglicéridos con respecto al aceite usado, el cual contiene aproximadamente un 0,9% p/p de los mismos, esto se explica como consecuencia de la especificidad sn-1,3 de las lipasas.

**Tabla 7.3** Porcentaje en peso de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG), e índice de acidez luego de la transesterificación de aceite usado con Eversa® Transform, hidro-esterificación con la lipasa ASL, transesterificación en dos pasos catalizada con Eversa® Transform y lipasa ASL, e hidrólisis con ASL y transesterificación con Eversa® Transform.

% p/p	Metodología de transesterificación			
	Eversa®	ASL	Eversa®/ ASL	ASL/ Eversa®
<b>FAME</b>	86,99	13,77	88,32	79,12
<b>MG</b>	4,81	2,05	7,87	15,21
<b>DG</b>	0,80	2,56	2,07	2,47
<b>TG</b>	1,43	81,49	0,82	1,40
<b>Índice de acidez</b>	3,45	1,10	3,96	3,60

**Tabla 7.4** Porcentaje en peso de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE), monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG), e índice de acidez luego de la transesterificación de aceite usado con Eversa® Transform, hidro-esterificación con la lipasa ASL, transesterificación en dos pasos catalizada con Eversa® Transform y lipasa ASL, e hidrólisis con ASL y transesterificación con Eversa® Transform.

% p/p	Metodología de transesterificación			
	Eversa®	ASL	Eversa®/ ASL	ASL/ Eversa®
<b>FAEE</b>	81,53	16,81	88,01	80,96
<b>MG</b>	8,81	0,98	2,53	5,14
<b>DG</b>	1,54	1,26	2,50	1,19
<b>TG</b>	4,54	80,42	1,10	8,89
<b>Índice de acidez</b>	7,24	0,88	11,75	7,86

**Tabla 7.5** Porcentaje en peso de ésteres propílicos de ácidos grasos (FAPE), monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG), e índice de acidez luego de la transesterificación de aceite usado con Eversa® Transform, hidro-esterificación con la lipasa ASL, transesterificación en dos pasos catalizada con Eversa® Transform y lipasa ASL, e hidrólisis con ASL y transesterificación con Eversa® Transform.

% p/p	Metodología de transesterificación			
	Eversa®	ASL	Eversa®/ ASL	ASL/ Eversa®
<b>FAPE</b>	95,18	16,16	94,81	80,75
<b>MG</b>	2,29	0,35	2,92	8,69
<b>DG</b>	0,68	3,01	0,36	2,33
<b>TG</b>	1,31	79,93	0,18	3,78
<b>Índice de acidez</b>	3,45	1,32	12,56	9,41

**Tabla 7.6** Porcentaje en peso de ésteres butílicos de ácidos grasos (FABE), monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG), e índice de acidez luego de la transesterificación de aceite usado con Eversa® Transform, hidro-esterificación con la lipasa ASL, transesterificación en dos pasos catalizada con Eversa® Transform y lipasa ASL, e hidrólisis con ASL y transesterificación con Eversa® Transform.

% p/p	Metodología de transesterificación			
	Eversa®	ASL	Eversa®/ ASL	ASL/ Eversa®
<b>FABE</b>	73,45	18,57	89,93	59,88
<b>MG</b>	0,66	0,22	5,20	1,86
<b>DG</b>	5,28	1,41	0,33	3,68
<b>TG</b>	17,71	79,56	0	29,73
<b>Índice de acidez</b>	6,15	0,44	10,08	10,11

En vista de los resultados obtenidos, se observa que la combinación de ambas lipasas no condujo a un aumento considerable en el porcentaje de ésteres obtenidos para las reacciones realizadas con metanol, etanol y 1-propanol. Sin embargo, en el caso de la

reacción con 1-butanol, al realizar la transesterificación utilizando la combinación de ambas lipasas se observó un considerable incremento del porcentaje de ésteres butílicos de ácidos grasos obtenidos siendo de 73,45% a 89,93% p/p (ver columna Eversa®/ASL en la Tabla 7.6).

Como se mencionó en el Capítulo 6, la baja conversión observada en la reacción catalizada con Eversa® Transform en la transesterificación de aceite usado con 1-butanol se atribuyó a la ausencia de activación de la lipasa que se produce en la interfase agua-aceite. En contraste, la lipasa ASL requiere la adición de un mayor volumen de agua en comparación con el biocatalizador comercial (50% v/p vs 2% v/p), lo que provoca la formación del sistema bifásico requerido para la activación de los sitios activos de la enzima.

## 7.7 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que la fracción insoluble del látex proveniente de los frutos de la planta *Araujia sericifera* tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis, esterificación y transesterificación del aceite de cocina usado de girasol.

La hidrólisis de aceite usado catalizada con esta lipasa alcanzó una conversión del 60% a monoglicéridos al agregarle un 50% p/p de agua y 0,05% p/p de ASL a una temperatura de 25°C durante 30 minutos. Por otra parte, se encontró que el agregado de un co-solvente orgánico no proporciona un aumento en la actividad del catalizador.

Se alcanzaron conversiones de 90-98% al llevar a cabo la esterificación con metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol de los ácidos grasos formados durante la hidrólisis. Estas conversiones fueron obtenidas al utilizar una relación molar aceite: alcohol 1:0,2 a 25°C por 10 horas, sin la necesidad de adicionar otra carga de ASL. Asimismo, se observó la conversión de mono- y diglicéridos principalmente en la primera hora de reacción, mientras que la concentración de triglicéridos se mantuvo estable.

Por otro lado, la combinación de lipasas fúngicas y vegetales, llevada a cabo mediante la transesterificación de aceite usado con Eversa® Transform y posterior hidro-esterificación con ASL mostró ser efectiva al usar 1-butanol como agente donador de acilos.

## 7.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Di Santo Meztler, P.; Fait, M. E.; Foresti, M. L.; Morcelle, S. R. (2014). Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex. *Catal. Sci. Technol.* 4, 1386–1394.
- Jiang, X.; Li, S.; Xiang, G.; Li, Q.; Fan, Lu.; He, L.; Gu, K. (2016). Determination of the acid values of edible oils via FTIR spectroscopy based on the OAH stretching band. *Food Chem.* 212, 585–589.
- Lafont, J. J.; Páez, M. S.; Torres, Y. C. (2011). Análisis Químico de Mezclas Biodiesel de Aceite de Cocina Usado y Diesel por Espectroscopia Infrarroja. *Inf. tecnol.* 22, 4, 35-42.
- Lima, L. N.; Oliveira, G. C.; Rojas, M. J.; Castro, H. F.; Da Rós, P. C. M; Mendes, A. A.; Giordano, R. L. C.; Tardioli, P. W. (2015). Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 523–535.
- Matkovic, S. R.; Nilsson, J. F.; Fait, M. E.; Morcelle, S. R.; Briand, L. E. (2016). Insights in the biocatalyzed hydrolysis, esterification and transesterification of waste cooking oil with a vegetable lipase. *Catal. Lett.* 146, 2341–2347.
- Monteiro, R. R. C.; Arana-Peña, S.; da Rocha, T. N.; Miranda, L. P.; Berenguer-Murcia, A.; Tardioli, P. W.; dos Santos, J. C. S.; Fernandez-Lafuente, R. (2021). Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renew. Energ.* 164, 1566–1587.
- Ortiz Tapia, M. C.; García Alamilla, P.; Lagunes Gálvez, L. M.; Arregoitia Quezada, M. I.; García Alamilla, R; León Chávez, M. A. (2016). Obtención de biodiesel a partir de aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.). Aplicación del método de ruta ascendente. *Acta Universitaria*, 26, 5, 3-10.

Sánchez, D. A.; Morcelle, S. R.; Fait, M. E.; Tonetto, G. M.; Ferreira, M. L. (2019). Application of a Multienzymatic System from Natural Latex in Key Reactions for oil-Based Biorefineries. *Fermentation* 5, 1, 18.

Vescovi, V.; Jimenez Rojas, M.; Baraldo, A. Jr.; Carrero Botta, D.; Montes Santana, F. A.; Piva Costa, J.; Machado, M. S.; Honda, V. K.; De Lima Camargo Giordano, R.; Tardioli, P. W. (2016). Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 1615–1624.

Zhang, Q.; Liu, C.; Sun, Z.; Hu, X; Shen, Q.; Wu, J. (2012). Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chem.* 132, 3, 1607-1613.

# CONCLUSIONES



**CONCLUSIONES DE LA TESIS**

Las investigaciones científicas que se realizaron en esta Tesis permitieron desarrollar nuevas estrategias de valorización del aceite comestible usado a través de reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación catalíticas para obtener ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos.

Según se discutió en el Capítulo 1, la hipótesis de trabajo se fundamentó en la potencialidad de los biocatalizadores enzimáticos y de los heteropolímeros sólidos con propiedades ácidas, para catalizar la conversión de los triglicéridos en sustancias con valor agregado. En este contexto, para demostrar la hipótesis se utilizaron metodologías experimentales y de tratamiento de datos que condujeron a las conclusiones que se presentan en esta sección. Es así que las investigaciones demandaron la aplicación de una amplia variedad de metodologías como son: la preparación de materiales, la síntesis orgánica, el análisis cuali y cuantitativo de sustancias por cromatografía gaseosa, el análisis elemental por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo ICP-OES, la caracterización de materiales a través de: fisiorción de nitrógeno para la determinación de superficie específica, el análisis termogravimétrico para establecer el contenido de agua y la estabilidad térmica, la quimisorción de moléculas sonda para el estudio de los sitios activos, el análisis molecular por espectroscopia infrarroja, el análisis textural por microscopia electrónica de barrido medioambiental y el microanálisis con sonda de electrones; y el análisis de parámetros operativos por ajuste no-lineal de datos para generar superficies que extendieron la aplicación de las evidencias experimentales.

La adecuada combinación de estrategias de análisis químico permitió caracterizar los sistemas trifásicos constituidos por una fase oleosa-biocatalizador-fase acuosa que se obtuvieron en la hidrólisis, esterificación y transesterificación de aceite usado catalizado con enzimas de origen vegetal (*Araujia sericifera* ASL) y fúngica (Eversa® Transform). A partir de estos datos, se diseñó una metodología adecuada y reproducible de obtención de muestras de los sistemas trifásicos. Además, el estudio detallado del análisis cromatográfico de los productos de reacción a través de una profunda revisión de la literatura, permitió asignar las señales de los mono y diglicéridos que habitualmente se encuentran en la transesterificación de aceite por catálisis enzimática. En este contexto,

se concluyó que la lipasa vegetal ASL es activa en la hidrólisis de aceite vegetal usado generando monoglicéridos y ácidos grasos a temperatura ambiente en 30 min, con 50% p/p de agua agregada y 0,05% de biocatalizador. A partir de este conocimiento, se diseñó una metodología de hidrólisis, seguida por la esterificación de los ácidos grasos con alcoholes de cadena corta (metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol) a temperatura ambiente sin necesidad de agregar más enzima al medio de reacción. Las reacciones en tándem condujeron a un 90 a 98% de conversión a ésteres de ácidos grasos.

Adicionalmente, se investigó la actividad catalítica del biocatalizador comercial Eversa® Transform en la transesterificación de aceite comestible usado. Si bien, se han publicado investigaciones utilizando metanol y etanol, en esta Tesis se abordó la transesterificación con 1-propanol y 1-butanol. Nuevamente, se evidenció la importancia de un correcto muestreo del sistema de reacción, tópico que no es debidamente indicado en la literatura.

El biocatalizador de origen fúngico es activo en la transesterificación del aceite usado con una relación molar aceite: alcohol de 1:6,8, 2% v/p de agua añadida y 1% v/p de biocatalizador a 35°C durante 24 h. Se han alcanzado conversiones de 97% hacia ésteres metílicos, etílicos y propílicos de ácidos grasos. En el caso particular del 1-butanol, la conversión fue de 79% debido a que la miscibilidad del medio de reacción impide la formación de la interface oleosa-acuosa necesaria para la activación de la enzima. En este contexto, se concluyó que la combinación del biocatalizador comercial y la lipasa vegetal ASL es un camino viable para extender la conversión de los triglicéridos hasta un 90% de ésteres butílicos.

Esta investigación también demostró que el heteropoliácido fosfotúngstico de Wells Dawson disperso sobre dióxido de titanio  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O/TiO_2$ , en contenidos superiores a la monocapa, es activo en la transesterificación de aceite comestible usado. La actividad catalítica está directamente influenciada por la elevada densidad de sitios ácidos del tipo Brønsted y en principio, se podría relacionar al comportamiento pseudo-líquido de los heteropolicompuestos.

A diferencia de los sistemas enzimáticos descritos anteriormente, la transesterificación de los triglicéridos por catálisis heterogénea con el heteropoliácido, no genera glicéridos parcialmente sustituidos y en general, es menor la proporción de

ácidos grasos libres. Si bien, se alcanzó un 75% de conversión de los triglicéridos con 74% de rendimiento a ésteres metílicos de ácidos grasos en menor tiempo de reacción que los sistemas biológicos (3 h vs 24 h); la temperatura (60°C vs 25-35°C) y la relación molar aceite: alcohol fue más elevada (1:9 vs 1:6,8).

Como conclusión final, se destaca que las investigaciones realizadas en esta Tesis permiten proponer estrategias de hidrólisis y/o transesterificación catalítica de aceite comestible tendientes a la generación de ésteres de ácidos grasos con potencial aplicación como biocombustibles.

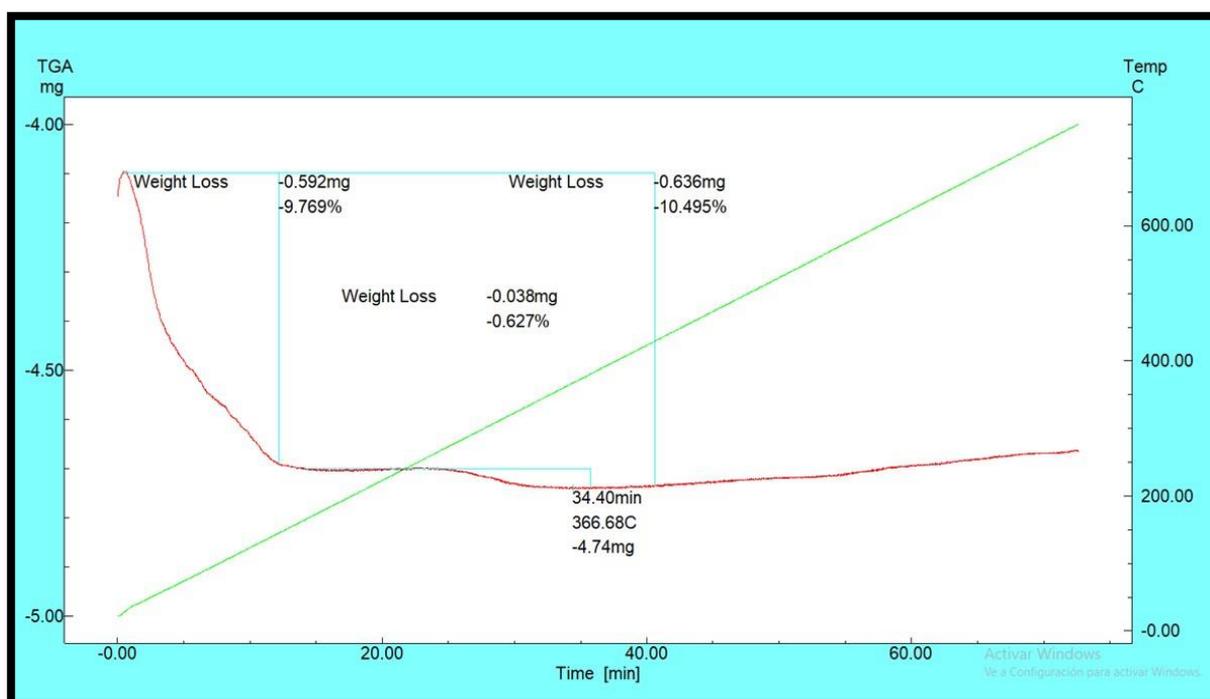
# ANEXOS



## ANEXO 1

**DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLAR DEL HETEROPOLIÁCIDO  
FOSFOTÚNGSTICO DE WELLS-DAWSON  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O$**

Con el fin de determinar el peso molecular del heteropoliácido utilizado en esta investigación, se llevó a cabo un análisis termogravimétrico del mismo. Para ello, se utilizó una masa de 6,06 mg de HPA  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot xH_2O$  y al aumentar la temperatura se observó una pérdida de 0,592 mg entre los 29,5 °C y 143,4°C y una segunda pérdida de 0,038 mg entre los 143,4°C y los 335,2°C.



Análisis termogravimétrico del heteropoliácido fosfotúngstico de  
Wells-Dawson desde 10°C hasta 750°C.

Línea roja: pérdida de masa en función del tiempo

Línea verde: temperatura en función del tiempo.

Al seguir aumentando la temperatura no se observaron más pérdidas de masa, por lo tanto, se concluyó que la masa del HPA anhidro es de 5,424 mg.

$$\text{Masa de } H_6P_2W_{18}O_{62} \text{ anhidro} = 6.060 \text{ mg} - 0,592 \text{ mg} - 0,038 \text{ mg} = 5,424 \text{ mg}$$

Sabiendo que la masa molar del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson anhidro  $H_6P_2W_{18}O_{62}$  es de  $4369,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , podemos calcular el número de moles que corresponden a la masa de HPA analizada en condiciones anhidras:

$$\text{Moles HPA anhidro} = \frac{\text{masa HPA anhidro. cant. de moles}}{\text{masa molar HPA anhidro}}$$

A partir de esta ecuación, se determinó que la muestra analizada contenía  $1,241 \times 10^{-6}$  moles del heteropoliácido. Asimismo, se calcularon los moles de agua correspondientes a la pérdida total de masa registrada durante el análisis,

$$\text{Moles agua} = \frac{\text{masa perdida. cant. de moles}}{\text{masa molar agua}}$$

Sabiendo que la pérdida total de agua fue igual a  $0,636 \text{ mg}$ , se calculó que la misma corresponde  $3,533 \times 10^{-5}$  moles.

La relación molar  $H_2O/HPA$  fue igual a  $28,5$ , dando una fórmula molecular  $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 28,5H_2O$  con una masa molar  $4882,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

## ANEXO 2

## PORCENTAJE DE HPA DISPERSADO EN DIÓXIDO DE TITANIO

A partir del análisis elemental por espectroscopia de dispersión de rayos X EDS, y teniendo en cuenta la fórmula molecular determinada a partir del análisis por termogravimetría, se calculó la relación W/Ti presentes en distintas zonas de los catalizadores 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> y 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> preparados durante esta Tesis.

Para ello, se utilizaron los datos de porcentaje en peso de Ti y W presente en la muestra, así como también su desviación estándar, proporcionados por los análisis de EDS. En función de estos, se calculó la superficie específica promedio, el porcentaje en peso de heteropoliácido dispersado sobre dióxido de titanio y la desviación estándar, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\left(\frac{\text{error } W}{\text{peso } W}\right)^2 = \frac{\text{desviación estandar}}{\text{porcentaje en peso } W \cdot 100}$$

$$\left(\frac{\text{error } Ti}{\text{peso } Ti}\right)^2 = \frac{\text{desviación estandar}}{\text{porcentaje en peso } Ti \cdot 100}$$

$$\text{Desviación estandar} = \frac{\text{peso } W}{\text{peso } Ti} \sqrt{\left(\frac{\text{error } W}{\text{peso } W}\right)^2 + \left(\frac{\text{error } Ti}{\text{peso } Ti}\right)^2}$$

$$\text{masa } TiO_2 = \frac{\text{porcentaje en peso } Ti \cdot PM_{TiO_2}}{PA_{Ti}}$$

$$\text{masa HPA} = \frac{\text{porcentaje en peso } W \cdot PM_{HPA}}{18 \cdot PA_W}$$

$$\text{superficie } TiO_2 = \frac{\text{superficie específica}_{TiO_2}}{\text{masa}_{TiO_2}}$$

$$dispersión = \frac{masa_{HPA} \cdot 1000}{superficie_{TiO_2}}$$

$$porcentaje \text{ en peso } \frac{HPA}{TiO_2} = \frac{masa_{HPA}}{masa_{HPA} + masa_{TiO_2}} \cdot 100$$

Donde el peso molecular del HPA ( $PM_{HPA}$ ) es igual a 4882,06 g/mol y el del dióxido de titanio ( $PM_{TiO_2}$ ) es 79,867 g/mol, el peso atómico de W y Ti son 183,84 y 47,867 g/mol, respectivamente, y la superficie específica del  $TiO_2$  es igual a 43,9322 m<sup>2</sup>/g.

Las tablas 1 y 2 muestran los datos obtenidos mediante análisis elemental por espectroscopia de dispersión de rayos X, EDS, para las muestras de 4% p/p HPA/ $TiO_2$  y 42% p/p HPA/ $TiO_2$ , respectivamente, mientras que las tablas 3 y 4 presentan los resultados de las ecuaciones anteriores para ambas muestras.

**Tabla 1.** Porcentaje en peso de titanio y tungsteno y la desviación estándar (DE) en el peso de Ti y W obtenidas del análisis por EDS de la muestra 4% p/p HPA/ $TiO_2$ .

% peso Ti	DE % peso W	% peso W	DE % peso W
54,79	0,0027	2,63	0,0017
54,02	0,0027	2,82	0,0017
54,17	0,0027	2,69	0,0017
55,52	0,0028	2,79	0,0017
55,41	0,0028	2,57	0,0017
55,69	0,0028	2,6	0,0017
54,37	0,0027	2,6	0,0017
56,72	0,0029	2,99	0,0017
54,72	0,0027	2,81	0,0017

**Tabla 2.** Porcentaje en peso de titanio y tungsteno y la desviación estándar (DE) en el peso de Ti y W obtenidas del análisis por EDS de la muestra 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>.

% peso Ti	DE % peso Ti	% peso W	DE % peso W
34,03	0,0017	30,86	0,0025
35,20	0,0018	27,9	0,0025
35,63	0,0018	27,22	0,0025
34,41	0,0016	22,46	0,0023
35,80	0,0018	27,92	0,0025
36,12	0,0018	27,94	0,0025
30,33	0,0016	34,05	0,0025
37,25	0,0019	27,51	0,0026
36,46	0,0019	28,76	0,0026

**Tabla 3.** Resultados de los cálculos de peso de W/peso de Ti en la muestra, error en el peso de W y Ti, la desviación estándar, masa de TiO<sub>2</sub> y del heteropoliácido, superficie de TiO<sub>2</sub> en la zona analizada, dispersión de heteropoliácido sobre TiO<sub>2</sub> y porcentaje en peso de HPA sobre TiO<sub>2</sub> para la muestra de 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>.

Peso W/ peso Ti	(error W/ peso W) <sup>2</sup>	(error Ti/ peso Ti) <sup>2</sup>	DE	Masa TiO <sub>2</sub> (g)	Masa HPA (g)	Sup. TiO <sub>2</sub> (m <sup>2</sup> )	Dispersión (mg HPA/ m <sup>2</sup> TiO <sub>2</sub> )	HPA/TiO <sub>2</sub> (%)
0,048	0,00418	0,00002	0,003	91,42	3,880	4016	0,966	4,07
0,052	0,00363	0,00002	0,003	90,13	4,160	3960	1,051	4,41
0,050	0,00399	0,00002	0,003	90,38	3,969	3971	0,999	4,21
0,050	0,00371	0,00003	0,003	92,64	4,116	4070	1,011	4,25
0,046	0,00438	0,00003	0,003	92,45	3,792	4062	0,934	3,94
0,047	0,00428	0,00003	0,003	92,92	3,836	4082	0,940	3,96
0,048	0,00428	0,00002	0,003	90,72	3,836	3985	0,962	4,06
0,053	0,00323	0,00003	0,003	94,64	4,411	4158	1,061	4,45
0,051	0,00366	0,00002	0,003	91,30	4,146	4011	1,034	4,34

**Tabla 4.** Resultados de los cálculos de peso de W/peso de Ti en la muestra, error en el peso de W y Ti, la desviación estándar (DE), masa de TiO<sub>2</sub> y del heteropoliácido, superficie de TiO<sub>2</sub> en la zona analizada, dispersión de heteropoliácido sobre TiO<sub>2</sub> y porcentaje en peso de HPA sobre TiO<sub>2</sub> para la muestra de 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub>.

Peso W/ peso Ti	(error W/ peso W) <sup>2</sup>	(error Ti/ peso Ti) <sup>2</sup>	DE	Masa TiO <sub>2</sub> (g)	Masa HPA (g)	Sup. TiO <sub>2</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Dispersión (mg HPA/m <sup>2</sup> TiO <sub>2</sub> )	HPA/TiO <sub>2</sub> (%)
0,907	0,00007	0,00002	0,009	56,78	45,529	2494	18,252	44,50
0,793	0,00008	0,00003	0,008	58,73	41,162	2580	15,953	41,21
0,764	0,00008	0,00003	0,008	59,45	40,159	2612	15,376	40,32
0,653	0,00010	0,00002	0,007	57,41	33,136	2522	13,137	36,59
0,780	0,00008	0,00003	0,008	59,73	41,191	2624	15,697	40,81
0,774	0,00008	0,00002	0,008	60,27	41,221	2648	15,569	40,62
1,123	0,00005	0,00003	0,010	50,61	50,235	2223	22,595	49,82
0,739	0,00009	0,00003	0,008	62,15	40,586	2730	14,864	39,50

En base a estos resultados, se determinó que la dispersión en ambas muestras fue homogénea y que el promedio del porcentaje en peso de heteropoliácido en la muestra denominada 4% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> es igual a 4,19 %, mientras que el promedio en la muestra llamada 42% p/p HPA/TiO<sub>2</sub> es igual a 41,61 %.

## ANEXO 3

## SUPERFICIES DE RESPUESTA

**Tabla 1.** Actividad específica del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la esterificación de ácido oleico con metanol variando cantidad de moles de metanol en exceso y cantidad de catalizador soportado HPA/TiO<sub>2</sub>. Condiciones: 20 g de ácido oleico, 85°C, 1 h, 150 rpm.

Exceso de metanol (moles)	Cantidad de catalizador (mg)	Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
0	24	0
2	16	128,20
2	24	142,82
2	32	84,68
6	24	41,26
6	32	0
6	48	0

**Tabla 2.** Actividad específica del catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> en la esterificación de ácido oleico con metanol variando la temperatura y velocidad de agitación. Condiciones: 20 g de ácido oleico, relación molar ácido oleico: metanol 1:3, 24 mg de catalizador, 1 h.

Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
60	150	21,48
60	350	175,19
60	650	306,80
65	150	103,92
65	350	153,47
70	150	215,13
70	350	65,38
70	650	185,68
85	150	142,82
85	350	0
85	650	0

**Tabla 3.** Tungsteno presente en los medios de reacción provenientes de las reacciones de esterificación de ácido oleico con metanol usando el catalizador 42% HPA/TiO<sub>2</sub> variando la temperatura y el tiempo de reacción. Condiciones: 20 g de ácido oleico, relación molar ácido oleico: metanol 1:3, 24 mg de catalizador, 150 rpm.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tungsteno lixiviado (ppm)
60	1	5,1
60	3	7,0
65	1	5,0
65	3	6,6
70	1	7,5
70	3	6,7
85	1	9,8
85	3	8,5

**Tabla 4.** Actividad enzimática específica de la lipasa del látex de *Araujia sericifera* en la hidrólisis de aceite usado en cocción variando la cantidad de ASL y de agua agregada. Condiciones: 10 g de aceite usado, 45 °C, 48 h, 200 rpm.

Cantidad de catalizador (mg)	Agua agregada (mL)	Actividad enzimática específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
2,5	5,0	0,66
5,0	5,0	7,38
7,5	5,0	0,76
5,0	2,5	0,65
5,0	7,5	1,33

**Tabla 5.** Actividad enzimática específica de la lipasa del látex de *Araujia sericifera* en la hidrólisis de aceite usado en cocción variando la cantidad de ASL y la temperatura. Condiciones: 10 g de aceite usado, 5,0 mL de agua, 48 h, 200 rpm.

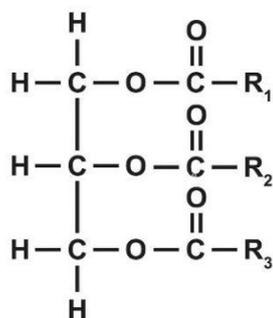
Cantidad de catalizador (mg)	Temperatura (°C)	Actividad enzimática específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
5,0	30	281,81
5,0	25	719,05
5,0	60	77,89
5,0	45	7,38
2,5	45	0
7,5	45	51,21

## ANEXO 4

## DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL ACEITE DE GIRASOL

A fin de calcular el peso molecular del aceite de girasol se llevó a cabo un estudio sobre la composición del mismo.

El aceite está compuesto principalmente por triglicéridos, los cuales son ésteres que se forman a partir del glicerol y tres ácidos carboxílicos de cadena larga. Los ácidos grasos que forman estos acilglicéridos pueden provenir de distintos ácidos como el oleico, linoleico, esteárico, palmítico, etc. (ver Figura 1).



**Figura 1.** Estructura molecular de los triglicéridos. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cadenas de hidrocarburos saturadas e insaturadas.

Debido a que la composición de los glicéridos es determinante para calcular el peso molecular de los mismos, se investigó el porcentaje de cada ácido graso presente en este aceite. Para ello, se llevó a cabo una búsqueda de investigaciones reportadas donde se hayan estudiado los porcentajes de ácidos grasos que forman parte del aceite de girasol. En la Tabla 1, se presenta la composición del aceite de girasol reportado por diferentes grupos de investigación, así como también la procedencia de este aceite en los casos que se informaron.

**Tabla 1.** Porcentaje de ácidos grasos presentes en aceite de girasol.

Porcentaje de ácidos grasos en el aceite (%)					Procedencia del aceite de girasol	Referencias bibliográficas
Ácido linoleico (18:2)	Ácido oleico (18:1)	Ácido estearico (18:0)	Ácido palmítico (16:0)	Otros		
72,9	17,1	2,9	7,1	---	Argentina	González Belo et al., 2014
47,0	42,2	6,2	4,6	---	Argentina	González Belo et al., 2014
55,5	27,9	3,3	5,4	1,2	Argentina	Muratorio et al., 2013
68-72	16-19	5	6	---	s/i	Ranni et al., 2017
56,03	32,00	3,67	6,55	1,75	s/i	Monfreda et al., 2012
57,9	30,0	3,1	6,1	3,4	Argentina	Prados et al., 2012
49-70	15-39	3-6	6-8	---	España	Lajara et al., 1990
62,7	24,5	4,8	7,6	---	s/i	Baydar & Erbas, 2005

s/i: sin informar

A partir de los porcentajes de ácidos grasos reportados en los trabajos citados en la Tabla 1, y teniendo en cuenta la estructura general de los triglicéridos, se calculó el peso molecular de cada aceite mediante la Ecuación 1:

$$PM = 173 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 3 \cdot \left( \frac{X_1 R_1 + X_2 R_2 + X_i R_i}{Y_i} \right) \frac{\text{g}}{\text{mol}} \quad (1)$$

Donde PM es el peso molecular del aceite en g/mol, X es la fracción molar de cada ácido graso, R el peso molecular de la cadena carbonada del ácido graso y  $Y_i$  es el número de cadenas R.

Como se puede ver en la Ecuación 1, el peso molecular de un triglicérido se determina mediante la sumatoria del peso molecular de las cadenas carbonadas multiplicados por la fracción molar obtenido de los porcentajes de cada ácido graso en el aceite de girasol, sumado al peso molecular de la parte que tienen en común todos los triglicéridos, el cual es igual a 173 g/mol. Con esta información se calcularon los pesos moleculares de los aceites según la composición reportada y el promedio de los mismos es igual a 876 g/mol.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Baydar, H. & Erbas, S. (2005). Influence of Seed Development and Seed Position on Oil, Fatty Acids and Total Tocopherol Contents in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turk. J. Agric. For.* 29, 179-186.
- González Belo, R.; Tognetti, J.; Benech-Arnold, R.; Izquierdo, N. G. (2014). Germination responses to temperature and water potential as affected by seed oil composition in sunflower. *Ind. Crops Prod.* 62, 537–544.
- Lajara, J. R.; Diaz, U.; Diaz Quidiello, R. Definite Influence of Location and Climatic Conditions on the Fatty Acid Composition of Sunflower Seed Oil. *JAOCs* 67, 10, 618-623.
- Monfreda, M.; Gobbi, L., Grippa, A. (2012). Blends of olive oil and sunflower oil: Characterisation and olive oil quantification using fatty acid composition and chemometric tools. *Food Chem.* 134, 2283–2290.
- Muratorio, A.; Cabello, R.; González, L.; Racca, E. (2013). Fatty acids composition of sunflower seed oil obtained from certified seeds sown in different regions of the Argentine Republic. Joint FAO/WHO Foods standards programme Codex Committee on fats and oils. 23<sup>o</sup> session, Malaysia.
- Prados, C. P.; Rezende, D. R.; Batista, L. R.; Alves, M. I. R.; Antoniosi Filho, N. R. (2012). Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. *Fuel* 96, 476-481.
- Ranni, R.; Sheoran, R. K., Sharma, B. (2017). Perspectives of Breeding for Altering Sunflower Oil Quality to Obtain Novel Oils. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 6(8), 949-962.

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

La investigación científica presentada en esta Tesis dio origen a los siguientes artículos publicados en revistas:

Paula S. Mateos, Claudia B. Ruscitti, Mónica L. Casella, Silvana R. Matkovic, Laura E. Briand. Phosphotungstic Wells-Dawson heteropolyacid as potential catalyst in the transesterification of waste cooking oil (2023). *Catalysts* 13(9), 1253.  
<https://doi.org/10.3390/catal13091253>

Paula S. Mateos, Silvana R. Matkovic, Claudia B. Ruscitti, Laura E. Briand (2023). Transesterificación de aceite usado utilizando heteropoliácido soportado con estructura de Wells-Dawson. *Revista de las Jornadas en Ciencias Aplicadas Dr. Jorge J. Ronco*, Portal de revistas de la U.N.L.P., Vol. 4  
<https://revistas.unlp.edu.ar/CienciasAplicadas/article/view/15867>

Paula S. Mateos, Mónica L. Casella, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (2023). Transesterification of waste cooking oil with a commercial liquid biocatalyst: Key information revised and new insights. *Journal of the American Oil Chemist's JAOCS* 100, 287-301.  
<http://dx.doi.org/10.1002/aocs.12683>

Paula S. Mateos, Marisa B. Navas, Susana R. Morcelle, Claudia Ruscitti, Silvana R. Matkovic, Laura E. Briand (2021). Insights in the biocatalyzed hydrolysis, esterification and transesterification of waste cooking oil with a vegetable lipase. *Catal. Today* 372, 211-219.  
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.09.027>

Adicionalmente, los resultados se comunicaron a través de los siguientes trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales:

Paula S. Mateos, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (3 al 5 de mayo de 2023). Revalorización de aceite usado en cocción a través de la transesterificación enzimática con Eversa® Transform. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, Argentina y Ambiente 2023– 4to Simposio Iberoamericano de Adsorción. San Luis, Argentina. Libro de resúmenes ISBN 978-987-46096-6-3, pp. 641-643.

Paula S. Mateos, M. Fernanda Hamet, Hernán P. Bideberripe, Mónica L. Casella, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (16 al 18 de marzo de 2022). Transesterificación enzimática de aceite usado en cocción. XXII Congreso Argentino de Catálisis. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Libro de Trabajos ISBN 978-987-48517-0-3, J-5683, pp. 1-6.

Paula S. Mateos, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (19 y 20 de octubre de 2021). Optimización de la actividad catalítica del heteropoliácido fosfotúngstico de Wells-Dawson en la reacción de esterificación de ácido oleico con metanol. VI Jornadas en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco". La Plata, Buenos Aires, Argentina. Revista de las Jornadas en Ciencias Aplicadas, Portal de revistas de la UNLP ISSN 2591-3565, 3(1), pp. 1-2.

Paula S. Mateos, M. Fernanda Hamet, Hernán P. Bideberripe, Marisa B. Navas, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (19 y 20 de octubre de 2021). Estudio del uso de Eversa® Transform como catalizador en la transesterificación de aceite de girasol usado. VI Jornadas en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco". La Plata, Buenos Aires, Argentina. Revista de las Jornadas en Ciencias Aplicadas, Portal de revistas de la UNLP ISSN 2591-3565, 3(1), pp. 1-2.

Paula S. Mateos, Marisa B. Navas, Susana R. Morcelle, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (17 al 18 de octubre de 2019). Biodiesel de segunda generación a partir de aceite comestible de desecho. V Jornadas en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco". La Plata, Buenos Aires, Argentina. Revista de las Jornadas en Ciencias Aplicadas, Portal de revistas de la UNLP ISSN 2591-3565, 2(i), pp. 1-2.

Paula S. Mateos, Marisa B. Navas, Susana R. Morcelle, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (18 al 20 de septiembre de 2019). Estudio de la actividad catalítica de la lipasa del látex de *Araujia sericifera* en la hidrólisis y esterificación de aceite comestible usado. XXI Congreso Argentino de Catálisis y el X Congreso de Catálisis del Mercosur. Santa Fe, Argentina. Libro de trabajos, ID#123, pp. 1-6.

Paula S. Mateos, Laura E. Briand, Silvana R. Matkovic (17 al 19 de octubre de 2018). Tratamiento de aceite comestible usado para la generación de biodiesel no competitivo con los alimentos. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Paula S. Mateos, M. Fernanda Hamet, Marisa B. Navas, Susana R. Morcelle, Silvana R. Matkovic (27 al 30 de noviembre de 2018). Investigación de la actividad catalítica de una lipasa vegetal en la síntesis de biodiesel de segunda generación. III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones y VIII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. San Luis, Argentina. Libro de resúmenes, trabajo P-25.