

SINTESIS DE ÉSTERES ALQUÍLICOS MEDIANTE ALCOHÓLISIS DEL ACEITE DE  
PALMISTE UTILIZANDO COMO CATALIZADOR LIPASA DE *Mucor miehei*

FABIÁN ENRIQUE CASTELLANOS MOLINA  
ROSA ALEXANDRA GONZÁLEZ SANTOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2004

SINTESIS DE ÉSTERES ALQUÍLICOS MEDIANTE ALCOHÓLISIS DEL ACEITE DE  
PALMISTE UTILIZANDO COMO CATALIZADOR LIPASA DE *Mucor miehei*

FABIÁN ENRIQUE CASTELLANOS MOLINA  
ROSA ALEXANDRA GONZÁLEZ SANTOS

Trabajo de grado presentado como requisito  
parcial para optar al título de Químico

Directora  
Janeth Aidé Perea V.  
Química, MSc. Doctora en Química

Codirector  
Fernando Martínez O.  
Químico. Doctor en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2004

## DEDICATORIA

*A Dios por guiarme siempre,  
A mis padres Victoriano y Gloria por el apoyo incondicional durante estos años,  
A amigos, compañeros y  
Con amor a Diego.*

*Rosa Alexandra*

*A mis dos madres y a mi Cé por cuidarme y acompañarme en el camino...*

*Fabián Enrique*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aidé Perea Villamil, directora de nuestro trabajo, por concedernos el acceso a su grupo de investigación, permitirnos ser receptores de sus conocimientos y por su gran apoyo académico.

Al Dr. Fernando Martínez, codirector del trabajo de investigación, por su colaboración y asesoría constante.

A la empresa C.I. SACEITES S.A. por su interés en nuestro trabajo, suministro de materias primas y parte de la bibliografía.

Al laboratorio de Catálisis y al laboratorio de Geología, especialmente al Dr. Mario García, por su colaboración concediendo el acceso a sus instalaciones y préstamo de equipos que permitieron concluir nuestra labor.

A Alejandro Torres, técnico de la Escuela de Química, por su valiosa ayuda en los análisis realizados.

A Luz Estela Torres, Ingeniera Civil (UIS), por suministrarnos la mayor parte de la bibliografía desde la Universidad de Mayagüez en Puerto Rico.

A COLCIENCIAS, por su valioso aporte económico.

A nuestros amigos del CICTA, quienes fueron compañía y apoyo constante.

A la Universidad Industrial de Santander, nuestra querida institución, por entregarnos conocimiento, sabiduría y alegría.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS ACEITES VEGETALES	4
1.2 ACEITE DE PALMISTE	5
1.2.1 Origen y descripción	5
1.2.2 Productos obtenidos y composición	6
1.2.3 Producción y aspectos económicos	8
1.2.4 Usos	10
1.3 MODIFICACIONES DE LOS ACEITES VEGETALES	11
1.4 LIPASAS	12
1.4.1 Conceptos básicos	12
1.4.2 Mecanismo de acción	14
1.4.3 Aplicaciones	15
1.4.4 Lipasas inmovilizadas	16
1.5 REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN	17
1.5.1 Generalidades	17

1.5.2	Sustratos	17
1.5.3	Catalizadores	19
1.5.4	Variables de proceso	22
1.6	MEJORAMIENTO DE PROCESOS MEDIANTE EL DISEÑO EXPERIMENTAL	26
1.7	PRODUCTOS: ÉSTERES Y SUS APLICACIONES	27
1.7.1	Biodiesel	27
1.7.2	Agentes aromatizantes	28
1.7.3	Solventes y productos fitosanitarios	29
1.7.4	Surfactantes	29
1.7.5	Sustitutos de grasas	30
1.8	MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	31
2.	METODOLOGÍA	33
2.1	MATERIALES	33
2.2	DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
2.2.1	Alcohólisis enzimática	33
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	38
2.3.1	Índice de acidez	38
2.3.2	Índice de saponificación	39
2.3.3	Solubilidad del alcohol en PKO	39

2.3.4 Actividad hidrolítica	40
2.3.5 Análisis de ácidos grasos en el sustrato PKO.	40
2.3.6 Análisis de ésteres grasos y acilgliceroles en productos	41
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
3.1 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS	44
3.1.1 Composición en ácidos grasos del PKO	44
3.1.2 Composición en TAG's del aceite de palmiste	46
3.1.3 Índice de acidez y de saponificación	47
3.1.4 Caracterización de productos	48
3.2 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA	50
3.2.1 Determinación de la actividad hidrolítica de Lipozyme IM	50
3.2.2 Evaluación del alcohol como sustrato	51
3.2.3 Determinación de las condiciones óptimas	56
4. CONCLUSIONES	75
5. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco	8
Tabla 2. Condiciones de reacción en el diseño de pruebas con diferentes alcoholes	34
Tabla 3. Variables y niveles del diseño de optimización	36
Tabla 4. Puntos del diseño CCRD	36
Tabla 5. Concentración de los patrones de ETE's	42
Tabla 6. Concentración de los patrones de TAG's	42
Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos en el PKO	44
Tabla 8. Composición porcentual de TAG's en el PKO	46
Tabla 9. Condiciones experimentales del diseño de <i>screening</i> de alcoholes	53
Tabla 10. Resultados obtenidos en los experimentos del diseño CCRD	57
Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) para $Y_1$ (% ésteres)	61
Tabla 12. Coeficientes de regresión para $Y_1$ (% ésteres)	61
Tabla 13. Condiciones óptimas iniciales (COI)	65
Tabla 14. Condiciones óptimas finales (COF) comparadas con estudios anteriores	67
Tabla 15. Ésteres obtenidos en reusos de Lipozyme IM a diferentes condiciones	74

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química de un triacilglicerol	4
Figura 2. Palma africana de aceite ( <i>Elaeis guineensis</i> )	6
Figura 3. Fruto de la palma africana	7
Figura 4. Producción mundial de aceite de palma en el año 2001	9
Figura 5. Producción mundial de aceite de palmiste en el año 2001	9
Figura 6. Estructura secundaria de la conformación inactiva de la lipasa de <i>M. miehei</i>	13
Figura 7. Mecanismo de acción de las lipasas en la hidrólisis de TAG's	15
Figura 8. Reacción general de transesterificación (alcohólisis)	17
Figura 9. Reacción de alcohólisis en triacilgliceroles	18
Figura 10. Áreas de aplicación de los ésteres de ácidos grasos	27
Figura 11. Estructura química de la <i>6-O-lauril-b-D-glucosa</i>	30
Figura 12. Montaje empleado para efectuar la reacción de alcohólisis	34
Figura 13. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en el PKO	45
Figura 14. Perfil cromatográfico de TAG's en el PKO	47
Figura 15. Perfil cromatográfico de TAG's en el patrón de PKO	48
Figura 16. Perfil cromatográfico del patrón de ETE's	49
Figura 17. Perfil cromatográfico de un producto obtenido por alcohólisis	49
Figura 18. Determinación de la actividad hidrolítica de Lipozyme IM	50
Figura 19. Curva de solubilidad de metanol en PKO	52
Figura 20. Curva de solubilidad de etanol en PKO	52

Figura 21. Comparación de solubilidad en PKO de metanol y etanol a 55°C	52
Figura 22. Variación en la producción de ésteres en función del alcohol	54
Figura 23. Diagrama de pareto para $Y_1$ (% ésteres)	58
Figura 24. Gráfico de efectos principales para $Y_1$	59
Figura 25. Superficie de respuesta $X_2$ vs. $X_1$ ( $X_3$ constante)	62
Figura 26. Superficie de respuesta $X_1$ vs. $X_3$ ( $X_2$ constante)	63
Figura 27. Diagrama de efectos principales para $Y_2$	64
Figura 28. Diagrama de pareto para $Y_2$ (% de acidez)	64
Figura 29. Seguimiento de la reacción en el tiempo a escala preparativa	66
Figura 30. Estabilidad operacional de Lipozyme IM a 55°C	68
Figura 31. Estabilidad operacional de Lipozyme IM a 40°C	69
Figura 32. Estabilidad de Lipozyme IM con adición de agua (condiciones COF)	70
Figura 33. Estabilidad de Lipozyme IM con adición de <i>silica gel</i> (condiciones COF)	71
Figura 34. Estabilidad de Lipozyme TL con adición de <i>silica gel</i> (condiciones COF)	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	<i>Acrylonitrile Butadiene Styrene</i> (acrilonitrilo butadieno estireno)
ACN	<i>Acyl Carbon Number</i> (número de carbonos de acilo)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación oficial de químicos analíticos)
Asp	<i>Aspartic acid</i> (Ácido aspártico)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i> (Sociedad Americana de pruebas y materiales)
$A_w$	Actividad acuosa
C10:0	Ácido cáprico
C12:0	Ácido laúrico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oléico
C18:2	Ácido linoléico
C8:0	Ácido caprílico
CCRD	<i>Central Composite Rotatable Design</i> (Diseño central compuesto rotatorio)
CNO	<i>Coconut Oil</i> (Aceite de coco)
COF	Condiciones óptimas finales
COI	Condiciones óptimas iniciales
COST	<i>Changing One Separate Factor at Time</i> (Cambio de un solo factor por separado)
DAG	Diacilglicerol
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i> (Agencia de protección ambiental)
ETE's	Ésteres etílicos
FAME's	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)

FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de drogas y alimentos)
FFA	<i>Free Fatty Acids</i> (Ácidos grasos libres)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
HCNO	<i>Hydrogenated Coconut Oil</i> (Aceite de coco hidrogenado)
His	<i>Histidine</i> (Histidina)
HPKO	<i>Hydrogenated Palm Kernel Oil</i> (Aceite de palmiste hidrogenado)
HPKS	<i>Hydrogenated Palm Kernel Stearin</i> (Estearina de palmiste hidrogenada)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alto desempeño)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)
HTGC	<i>High Temperature Gas Chromatography</i> (Cromatografía gaseosa de alta temperatura)
IU	<i>International Units</i> (unidades internacionales)
kPa	kilopascal
LLL	Trilaurina
MAG	Monoacilglicerol
MTM	Millones de toneladas métricas
NTC	Norma Técnica Colombiana
PAG's	Acilgliceroles parciales (MAG's + DAG's)
pH	Potencial de hidrógeno
PKO	<i>Palm Kernel Oil</i> (Aceite de palmiste)
PKS	<i>Palm Kernel Stearin</i> (Estearina de palmiste)
PO	<i>Palm Oil</i> (Aceite de palma)
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i> (Cloruro de polivinilo)
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
RDB	<i>Refined, Bleached, Deodorized</i> (Refinado, desodorizado y blanqueado)
reqm	Relación estequiométrica
rpm	Revoluciones por minuto

RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (Metodología de superficie de respuesta)
Ser	<i>Serine</i> (Serina)
SFC	<i>Solid Fat Content</i> (Contenido de grasa sólida)
TAG	Triacilglicerol
Thr	<i>Threonine</i> (Treonina)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina)
ton	Toneladas
Val	<i>Valine</i> (Valina)
X <sub>1</sub>	Cantidad de enzima
X <sub>2</sub>	Relación molar alcohol/aceite
X <sub>3</sub>	Tiempo de reacción
Y <sub>1</sub>	Respuesta 1: % de ésteres etílicos en la mezcla de reacción
Y <sub>2</sub>	Respuesta 2: % de ácidos grasos libres en el producto

## RESUMEN

### TÍTULO

SINTESIS DE ÉSTERES ALQUÍLICOS MEDIANTE ALCOHÓLISIS DEL ACEITE DE PALMISTE UTILIZANDO COMO CATALIZADOR LIPASA DE *Mucor miehei*\*

### AUTORES

Castellanos Molina, Fabián Enrique. González Santos, Rosa Alexandra.\*\*

### PALABRAS CLAVES

Alcoholisis, Aceite de Palmiste, Ésteres alquílicos, Proceso enzimático, Lipasa inmovilizada, Diseño experimental.

### DESCRIPCIÓN

La alcoholisis es un proceso utilizado en la modificación de aceites vegetales para obtener ésteres alquílicos de ácidos grasos, utilizados directamente o como materia prima para la fabricación de aditivos alimenticios, surfactantes, emulsificantes, sustitutos de grasas, productos cosméticos, agentes aromatizantes y biocombustibles.

En este trabajo se llevó a cabo la reacción de alcoholisis mediante un proceso enzimático empleando como catalizador lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* y como sustratos aceite de palmiste y un alcohol de bajo peso molecular con el fin de dar un mayor valor agregado al aceite de palma africana.

En la primera fase del trabajo se evaluó la solubilidad de diferentes alcoholes en el aceite, seguido de un *screening* con los alcoholes propuestos. Se seleccionó el etanol para determinar los parámetros óptimos de reacción.

En la segunda fase se realizó el proceso de optimización empleando un diseño experimental para obtener los valores óptimos de las variables estudiadas. La variable respuesta fue el porcentaje de ésteres etílicos.

Optimizadas las variables, se llevó la alcoholisis a escala preparativa realizándose un seguimiento de la reacción y el análisis de la estabilidad operativa al reutilizar la enzima bajo factores tales como adición de agua y de un agente protector como *silica gel* en el medio de reacción. El porcentaje de ésteres no superó el 67% en reusos sucesivos de Lipozyme IM para lo cual se decidió de manera exploratoria emplear la lipasa inmovilizada Lipozyme TL con y sin la adición de *silica gel*.

El aporte más importante fue establecer que la reacción de alcoholisis por un proceso enzimático se puede ser llevada a cabo en un medio libre de solvente y sin adición de agua exógena tanto a escala laboratorio como preparativa, obteniéndose la estabilidad operacional de la enzima en los reusos al utilizar Lipozyme TL con adición de *silica gel*.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Janeth Aidé Perea V

## ABSTRACT

### **TITLE**

SYNTHESIS OF ALKYL ESTERS BY ALCOHOLYSIS OF PALM KERNEL USING CATALYTIC LIKE LIPASE FROM MUCOR MIEHEI\*

### **AUTHORS**

Castellanos Molina, Fabián Enrique. González Santos, Rosa Alexandra.\*\*

### **KEY WORDS**

Alcoholysis, palm kernel, fatty acid alkyl esters, enzymatic process, immobilized lipase, experimental Design.

### **DESCRIPTION**

The alcoholysis is a process used in the vegetal oil modification to obtain alkyl esters of greasy acids, used even directly or as like raw material for the manufacture of nutritional additives, surfactants, emulsificants, cosmetic products, perfuming agents and biocombustibles.

In this work the reaction of alcoholysis by means of an enzymatic process was carried out using immobilized lipase from *Mucor miehei* as catalyst and oil of palmiste as substrates and an alcohol of low molecular weight with the purpose of giving a greater added value to the oil of African palm.

In first stage of the work it was evaluated the solubility of different types of alcohol in the oil, followed of screening with the proposed alcohols. It was selected the ethanol to determine the optimal parameters of reaction.

In the second phase It was carried out the optimization of the process by using an experimental design to obtain the optimal values of the studied variables. The variable answer was the percentage of etilyc esters.

Once the variables where optimized, the alcoholysis took place on preparatory scale being made a pursuit of the reaction and the analisis of the operative stability when the enzyme where reused under factors such as the addition of water and a protective agent as gel silice in reaction means.

The percentage of esters did not surpass 67% in successive reused of Lipozyme IM for which it was decided in a exploratory way the use of the immobilized lipase such as Lipozyme TL with and without the addition of silicifies gel.

The most important contribution of this work was to establish that the reaction of alcoholysis by an enzymatic process can be carried out in a free solvent media and without the addition of exogenous water either on lab scale or preparatory scale, obtaining the operational stability of the enzyme in the reused when Lipozyme TL where used with addition of silicifies gel.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Janeth Aidé Perea V

## INTRODUCCION

En Colombia una gran porción de tierra se encuentra dedicada al cultivo de la palma africana (aprox. 169000 hectáreas) y así mismo a la producción de aceites de palma y palmiste. La producción de aceite de palmiste crudo en el 2001 fue de 49781 toneladas, con una tasa de crecimiento anual del 9,6%, (desde 1997 hasta el 2001) y una oferta disponible para el consumo interno de 24381 toneladas [26]. Debido a la gran oferta, es provechoso encontrar nuevos métodos para el desarrollo de productos a partir del aceite de palmiste que sean una alternativa para aquellos ya existentes en el mercado, bien sea por sus propiedades fisicoquímicas o por sus métodos novedosos de elaboración.

El aceite de palmiste no ha sido explotado por completo y actualmente presenta usos limitados en la preparación de jabones y algunos productos de confitería. Este aceite por su composición particular en ácidos grasos puede aprovecharse en la fabricación de ésteres grasos y otros oleoquímicos que se emplean como materia prima de diversos productos, haciendo uso de tecnologías limpias basadas en los planteamientos del desarrollo sostenible y la química verde [14, 65, 84].

Las enzimas como catalizadores juegan un papel importante en el desarrollo de las transformaciones limpias. Los métodos para producción de ésteres grasos se conocen y se han estudiado desde hace varios años y comúnmente emplean catalizadores químicos contaminantes, siendo posible reemplazarlos por algunos más favorables como son las enzimas. En especial, las lipasas son catalizadores sumamente amigables, fáciles de manipular y recuperables para su reutilización o desecho.

Las enzimas en los últimos años han adquirido nuevas aplicaciones en el área oleoquímica debido a su gran actividad catalítica, inocuidad y buen desempeño en reemplazo de las bases orgánicas. Sin embargo, es necesario mejorar las condiciones involucradas en los procesos enzimáticos haciéndolos más eficientes y productivos, empleando herramientas como el diseño experimental y el análisis estadístico.

Se ha reconocido después de varios años que el papel de las ciencias naturales es central para el desarrollo de tales procesos mejorados y para la solución de problemas que conciernen al medio ambiente. A través de la utilización de la química y ciencias moleculares, hay una creciente apreciación del área emergente de la química verde, necesaria en el mantenimiento del desarrollo sostenible.

La química verde se ha definido como “la invención, diseño y aplicación de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso y generación de sustancias nocivas” [88]. Recientemente se ha propuesto una estrategia básica para implementar las relaciones entre industria y academia, fundada en la investigación a través de la química verde. La IUPAC ha jugado un rol central en el avance y la promoción de esta área de la química.

La aplicación de la química verde se enfoca en el uso de materias primas renovables, uso de reactivos inocuos, empleo de procesos naturales (biosíntesis, biocatálisis), diseño de químicos más seguros, desarrollo de condiciones que incrementen la selectividad del producto y disminución del consumo energético, en términos de entradas mecánicas, térmicas y eléctricas [88].

Los procesos enzimáticos aplicados en el área de la oleoquímica, siguen de cerca las pautas de la química verde. En el presente trabajo se ha usado un aceite vegetal como fuente renovable para producir derivados naturales a través de un proceso amigable con la salud humana y el ambiente, empleando la ciencia química de manera responsable.

Este trabajo de investigación fue financiado por COLCIENCIAS, se desarrolló en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de alimentos (CICTA) y contó con la colaboración de la empresa C.I. Santandereana de Aceites (C.I SACEITES S.A) quien donó las muestras de aceite de palmiste y suministró parte de la bibliografía.

El estudio realizado en este trabajo fue presentado en el Seminario Internacional de Química verde organizado en Francia el 19 de mayo del 2003 y en el Seminario Internacional de Grasas y Aceites celebrado en la ciudad de Quito (Ecuador) en Noviembre del 2003.

El presente documento se distribuye de la siguiente manera:

Capítulo 1. Fundamento Teórico: Se describen los aspectos más importantes del aceite de palmiste, las lipasas y los procesos de alcoholólisis en la modificación de aceites, además se incluyen los avances recientes a nivel mundial.

Capítulo 2. Metodología: Se describen los pasos seguidos en el desarrollo experimental y los métodos empleados en el análisis químico.

Capítulo 3. Análisis de Resultados: Se exhiben los resultados obtenidos y se realiza un análisis de ellos de manera breve y clara.

Capítulo 4. Conclusiones

Capítulo 5. Recomendaciones

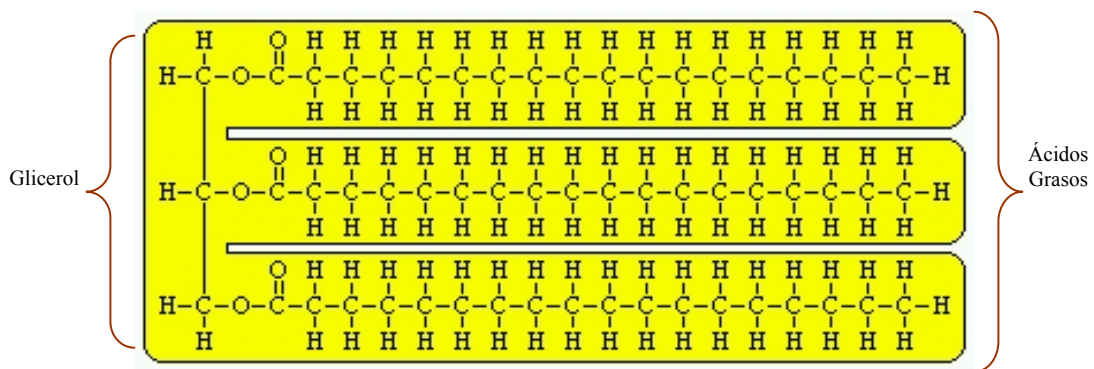
# 1. FUNDAMENTO TEORICO

## 1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS ACEITES VEGETALES

Las grasas y aceites de origen vegetal y animal son reconocidos como nutrientes esenciales en la alimentación humana. Se consideran también materia prima para gran variedad de productos químicos empleados en áreas no alimenticias (oleoquímicos). Los aceites vegetales comprenden un amplio mercado mundial y se destacan por su mayor producción y consumo el aceite de palma, soya, girasol y colza entre otros [105].

Las grasas están presentes en cantidades variables en los alimentos, son insolubles en agua y solubles en la mayoría de solventes orgánicos. A temperatura ambiente su consistencia varía de líquido a sólido: cuando aparecen sólidos comúnmente se les denomina grasas y cuando son líquidos aceites. Todas las grasas y aceites comercialmente importantes son de origen animal o vegetal y están compuestos por una clase simple de lípidos llamados triacilgliceroles (TAG's). En términos químicos un triacilglicerol consiste en una molécula de glicerol esterificada con tres moléculas de ácidos grasos (Figura 1) [105].

Figura 1. Estructura química de un triacilglicerol



Los TAG's normalmente representan más del 95% en peso de los aceites alimentarios, sin embargo también se presentan componentes minoritarios como monoacilgliceroles (MAG's), diacilgliceroles (DAG's), ácidos grasos libres (FFA's), fosfátidos, carotenoides y vitaminas.

Los mono y diacilgliceroles son ésteres de uno o dos ácidos grasos y glicerol. Son importantes agentes emulsificantes y se emplean frecuentemente en los alimentos. Los ácidos grasos libres son ácidos no esterificados presentes en el aceite. Algunos aceites no refinados presentan un alto contenido en ácidos grasos libres, los cuales generalmente se eliminan en un proceso de refinado [105].

## **1.2 ACEITE DE PALMISTE**

**1.2.1 Origen y descripción.** La *Elaeis* es un género de las plantas palmáceas de la cual se reconocen dos especies diferentes: la *E. guineensis* (origen africano) y la *E. oleifera* (origen americano). Desde el punto de vista comercial la *E. guineensis* es la más importante y se conoce comúnmente como “Palma africana” (Figura 2). La palma es una planta heliófila que no tolera ambientes muy boscosos, por el contrario crece en zonas deforestadas o perturbadas y en grandes plantaciones generalmente cerca a la población humana. Actualmente puede considerarse una de las especies tropicales de mayor importancia y constituye el cultivo de mayor crecimiento en las regiones tropicales [25].

Su origen ha sido muy discutido, desde 1933 se planteó la teoría de que la *E. guineensis* era originaria del norte de Sudamérica y se sugirió que el origen de la especie se encontraba en el nuevo mundo. Sin embargo, estos planteamientos no fueron aceptados seriamente debido al poco sustento por evidencias etnobotánicas, históricas y lingüísticas. El principio actualmente aceptado es que la *E. guineensis* tiene su origen en el África [25].

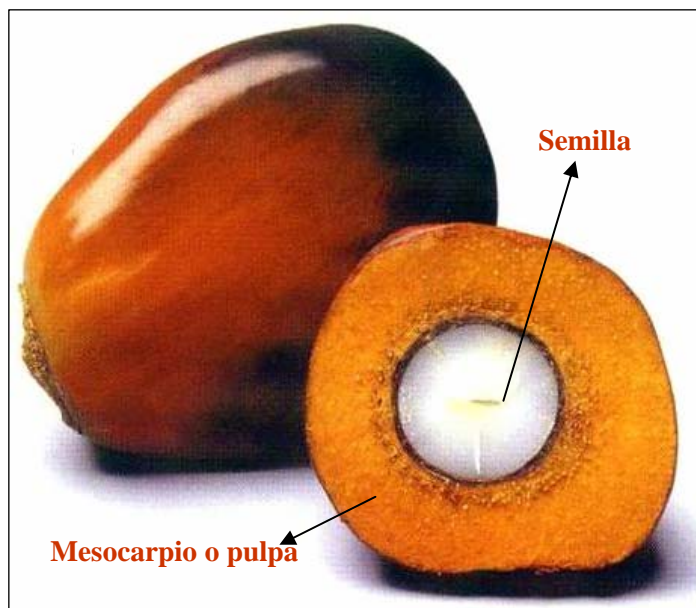
Generalmente se presentan 4 variedades de la *Elaeis guineensis*: Albescens, Dura, Pisifera, Nigrescens, Tenera y Virescens. La variedad cultivada en casi todas las plantaciones del mundo es el híbrido Tenera, (cruce entre Dura y Pisifera) del cual se obtiene el más alto rendimiento de aceite por hectárea de todos los cultivos de oleaginosas (4,5 ton de aceite/ Ha) [55, 68].

Figura 2. Palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*)



**1.2.2 Productos obtenidos y composición.** Del fruto de la palma es posible la extracción de dos aceites diferentes: del mesocarpio o pulpa, el aceite de palma (PO) y de la semilla el aceite de palmiste (PKO) (Figura 3). Las características del aceite obtenido del mesocarpio varían según los métodos empleados en su extracción y el tiempo transcurrido entre la cosecha de los frutos y la extracción. La característica principal del aceite de palma es la presencia en su parte insaponificable de un elevado contenido de carotenoides ( $\beta$ -caroteno 60-70%,  $\alpha$ -caroteno de 30-40% y  $\gamma$ -caroteno en trazas), en el mesocarpio el contenido de carotenos puede ser hasta del 1 por 1000. El aceite de palma posee características organolépticas particulares como su color rojo anaranjado, aspecto granular y fuerte olor floral [55].

Figura 3. Fruto de la palma africana



La semilla o palmiste representa aproximadamente entre el 5 y el 12 % del peso del racimo del fruto de la palma y esta disponible a una tasa de 10-13 % con respecto al peso del aceite de la pulpa, por consiguiente constituye un subproducto importante del proceso de extracción del aceite de palma. Sobre base húmeda el palmiste contiene entre 47-50% de aceite, cuyas propiedades y características difieren considerablemente a las del aceite de la pulpa. La composición del PKO y por tanto sus propiedades se asemejan a las del aceite de coco (CNO), pero pueden variar levemente dependiendo del fruto y su región de origen. En la Tabla 1, se muestra la composición típica de los aceites de palma, palmiste y coco [68, 86]

El PKO no posee aplicaciones tan amplias en productos alimenticios como el aceite de palma, sin embargo presenta ácidos grasos de cadena intermedia ( $C_8$ - $C_{14}$ ) haciéndolo especialmente atractivo en la fabricación de detergentes y emulsificantes. El PKO hace parte de los aceites láuricos junto con el aceite de coco y de babassu. El 70% de sus ácidos grasos poseen cadenas de carbono desde  $C_6$  a  $C_{14}$ , y en total hasta el 50 % es ácido láurico ( $C_{12}$ ). El PKO está constituido por 87 triacilglicérols diferentes catalogados en 13 grupos según su número de carbono, del  $C_{30}$  al  $C_{54}$ , los cuales conforman el 99.9% de TAG's totales en el aceite [102].

Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en aceites de palma, palmiste y coco

Ácido graso	Aceite de palma	Aceite de palmiste	Aceite de coco
Caprónico (C <sub>6</sub> )	-	0,3	0,4
Caprílico (C <sub>8</sub> )	-	4,2	7,3
Cáprico (C <sub>10</sub> )	-	3,7	6,6
Laúrico (C <sub>12</sub> )	0,2	48,7	47,8
Mirístico (C <sub>14</sub> )	1,1	15,6	18,1
Palmítico (C <sub>16</sub> )	44,1	7,5	8,9
Oléico (C <sub>18:0</sub> )	4,4	1,8	2,7
Linoléico (C <sub>18:1</sub> )	39,0	14,8	6,4
Linolénico (C <sub>18:2</sub> )	10,6	2,6	1,6
Otros	0,75	0,1	0,1

Fuente: Malaysian Palm Oil Board, 2001

**1.2.3 Producción y aspectos económicos.** La producción mundial de aceite de palmiste aumentó un 8% anual, de 2427 millones de toneladas métricas (MTM) en 1998 a 3292 MTM en el 2002, en contraste con un crecimiento anual del 4,9 % en la producción de aceite de coco. La abundancia del aceite de palmiste ha estimulado su uso en la producción de oleoquímicos y grasas especializadas [26].

Los productores de aceite de palma consideran el palmiste como un subproducto que no incluyen en los cálculos para determinar los costos de producción del aceite de palma, por consiguiente no es fácil determinar el costo de producción del palmiste. Las palmisterías tienen que distribuir los costos de trituración de palmiste entre el aceite y la torta, con el fin de obtener un costo estimado en la producción del aceite. A pesar de la dificultad para establecer el costo de producción, su valor en términos de precio en el mercado se puede determinar fácilmente. Dado que el PKO tiene características físico-químicas semejantes a las del CNO, los precios de estos dos aceites siempre son cercanos [7].

El PKO tiene una ventaja adicional cuando compite con CNO tanto por su precio como por el rápido crecimiento de la oferta, además el procesamiento del aceite de palmiste sigue muy de cerca las tendencias en el desarrollo del aceite de palma. Hace algunos años, el aceite crudo

de palmiste fue la principal forma para su exportación, pero hoy día como resultado del establecimiento de refinерías en la mayoría de países productores, cada vez se exporta más aceite refinado de palmiste, al igual que el de palma. Los mayores productores mundiales y sus aportes en aceite de palma y palmiste se muestran en las Figuras 4 y 5 respectivamente [7].

Figura 4. Producción mundial de aceite de palma en el año 2001 (en miles de toneladas)

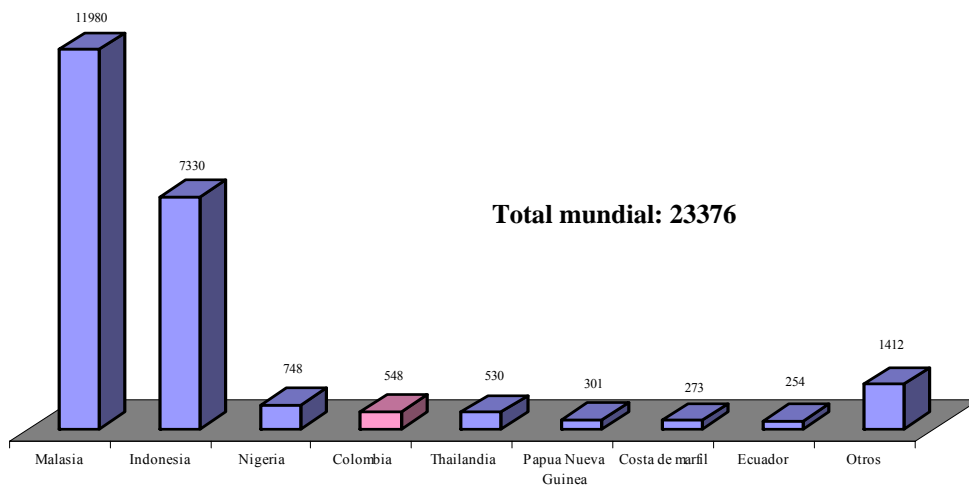
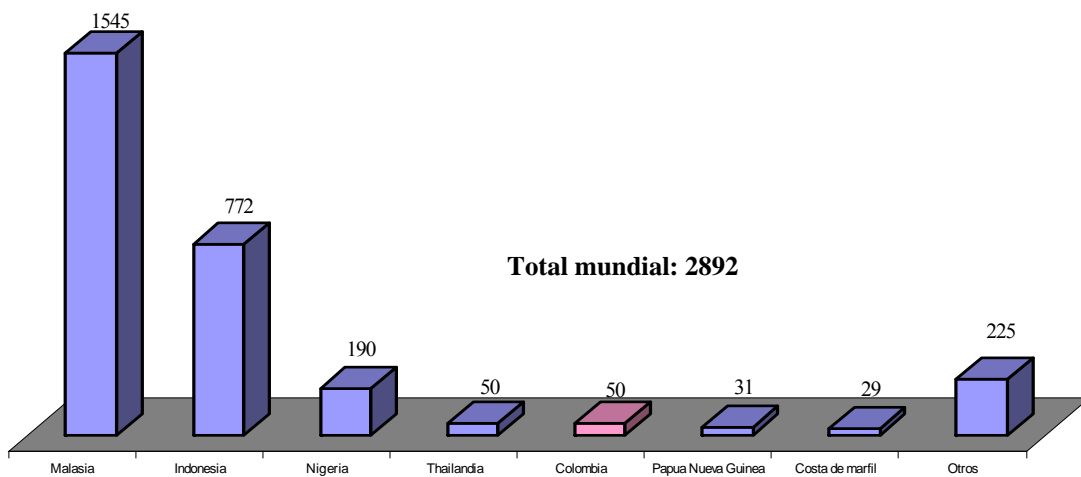


Figura 5. Producción mundial de aceite de palmiste en el año 2001 (en miles de toneladas)



Una hectárea de palma de aceite produce un promedio de 0,5 ton de aceite de palmiste y aprox. 0,4 ton de torta de palmiste. La sola producción del PKO comparada con cualquier otra semilla oleaginosa y sumando las 4 ton/Ha. del aceite de palma, hacen la productividad

de la palma de aceite sumamente alta (4,5 ton de aceite total /Ha en comparación con 0,5 ton/Ha de la soya) [7].

**1.2.4 Usos.** Posee usos similares al aceite de coco tanto en el área alimenticia como no alimenticia, aunque existen pequeñas diferencias en su composición que los distinguen. El PKO es más insaturado y por tanto puede ser hidrogenado a un mayor rango de productos para la industria de alimentos, mientras que el CNO tiene un mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta, haciéndolo más atractivo para la industria oleoquímica.

La mayor parte del PKO mundial se emplea en alimentos, sin embargo los usos no alimenticios están incrementando su importancia debido a que ofrecen un valor agregado a las materias primas y mayores oportunidades de empleo local en los países productores. También sus mercados mundiales son más fáciles de penetrar puesto que no dependen de los gustos nacionales o apreciaciones subjetivas. El aceite de palmiste abarca tres conjuntos de aplicaciones principales [7, 68, 69].

- **Fabricación de jabón.** El jabón es un olequímico pero usualmente se clasifica por separado ya que tiene mercados y usos completamente diferentes. A medida que se conocen mejor las ventajas técnicas del aceite de palmiste, más países lo utilizan como sustituto del aceite de coco en las fórmulas para jabón. Además el PKO tiende a venderse a un precio más bajo que el aceite de coco y esto favorece su empleo.

Un buen jabón debe contener al menos 15% de aceite láurico para rápido enjuague. Los jabones en Europa oriental y Estados Unidos contienen típicamente entre el 20 y 25% de PKO o CNO mientras que un jabón para agua de mar debe estar basado virtualmente en 100% de aceite láurico. Los aceites láuricos confieren dureza, buena solubilidad y rápido enjuague, su mayor resistencia a la oxidación detiene la rancidez y deterioración del perfume lo cual es una consideración principal en un jabón de tocador.

- **Producción de grasas especializadas.** Gracias a las propiedades de fusión de las grasas láuricas, son útiles en fórmulas de confitería como sustitutos de la manteca de cacao. No obstante el consumo del PKO en esta industria es limitado por el tamaño del mercado, el cual comparte con el aceite de coco y las grasas equivalentes a la manteca de cacao que se

producen con base a la fracción intermedia del aceite de palma o el aceite de soya hidrogenado. Como grasa especial se emplea por ejemplo, estearina de palmiste (PKS), la cual posee propiedades similares a la manteca de cacao. La estearina hidrogenada de palmiste (HPKS) se usa también en productos moldeados de chocolate y coberturas de galletas, en los rellenos de galletas finas, rellenos de *wafers* y tortas.

En *toffes* y caramelos estas grasas se incorporan para darles textura, dureza, cuerpo y riqueza de sabor. Las grasas empleadas para tal fin son usualmente basadas en aceite de palmiste hidrogenado (HPKO) u oleína de PKO a causa de sus propiedades de fusión rápidas y larga vida de anaquel. El PKO y CNO son las mejores grasas para helados no lácteos debido a su alto contenido de grasa sólida (SFC) a 0°C, a su bajo punto de fusión y textura suave. Las cremas para café no lácteas están hechas a base de HPKO y aceite de coco hidrogenado (HCNO). También se fabrican margarinas y triglicéridos de cadena media.

- **Producción de oleoquímicos.** Los productos oleoquímicos básicos hechos de grasas láuricas incluyen ácidos grasos, glicerina, ésteres, alcoholes grasos, aminas y estos a su vez son materia prima para las industrias de detergentes, productos cosméticos y farmacéuticos. Los modernos productos oleoquímicos son de importancia creciente debido a que proceden de fuentes naturales renovables y son fácilmente biodegradables en comparación con los derivados del petróleo.

### 1.3 MODIFICACIONES DE LOS ACEITES VEGETALES

Los aceites en general pueden someterse a ciertas transformaciones químicas que modifican sus propiedades y los hacen funcionales en diferentes áreas. Entre las más importantes se destacan la hidrogenación y la transesterificación [6].

La hidrogenación es un proceso en el cual se adiciona hidrógeno directamente a los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados de manera que se saturan. Con ello se logra convertir aceites líquidos en grasas semisólidas con mayor utilidad en ciertos alimentos. También se logra incrementar la estabilidad térmica y a la oxidación.

La transesterificación es un proceso donde dos o más ésteres intercambian grupos acilo para formar otro éster y es discutida en detalle más adelante. El aceite de palmiste hidrogenado o transesterificado es una excelente materia prima para fabricación de triglicéridos de cadena media, jabones y otros oleoquímicos. También se emplea como sustituto de manteca de cacao en margarinas, helados y productos de confitería. Para efectuar la reacción de transesterificación es indispensable el uso de un catalizador adecuado, de tipo químico o enzimático. Como catalizadores enzimáticos las lipasas han adquirido importancia gradual lo que hace meritorio su estudio y atención especial [48, 68]

## 1.4 LIPASAS

**1.4.1 Conceptos básicos.** Las lipasas microbianas (triacilglicerol hidrolasas E.C. 3.1.1.3) han sobrepasado las expectativas en el desarrollo de la biotecnología moderna. Las lipasas son enzimas de estructura proteica indispensables para la bioconversión de lípidos en el metabolismo de los organismos. En adición a su significado biológico tienen un gran potencial en áreas como la tecnología de alimentos, ciencias biomédicas e industrias químicas [28, 42].

Las lipasas actúan como catalizadores en procesos de hidrólisis de acilgliceroles, sin embargo, si el nivel de agua es bajo, pueden catalizar las síntesis de ésteres a partir de triacilgliceroles o ácidos grasos libres. Aunque se distribuyen a través de toda la flora y fauna se encuentran más abundantemente en la flora microbiana que comprende bacterias, hongos y levaduras. También se encuentran en el páncreas de los mamíferos y en las plantas superiores [67].

Con base en sus características de origen se ha realizado una clasificación de acuerdo a su actividad enzimática: regioespecíficas, las cuales actúan sobre los triacilgliceroles en las posiciones 1 y 3 o sólo la posición 2, pertenecen a ellas *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus arrhizus*. No específicas, que actúan sobre cualquier posición en el triacilglicerol, como *Penicillium expansum* y *Aspergillus sp.* Estereoespecíficas, que actúan sobre las posiciones sn-1 o sn-3, por ejemplo *Humicola lanuginosa* (sn-1) y *Fusarium solara* (sn-3). [96]. Ellas catalizan un amplio rango de reacciones las cuales incluyen hidrólisis, interesterificación, alcoholólisis, acidólisis, esterificación y aminólisis. Además, actúan bajo

condiciones muy suaves, pueden ser usadas en una variedad de solventes orgánicos y mostrar selectividad para un tipo de reacción específico. Poseen la característica única de actuar en la interfase acuosa y no acuosa, lo que las distingue de las esterasas. [28,67]

Recientes estudios estructurales hechos con varias lipasas han aportado algunas ideas para comprender la actividad hidrolítica, la activación interfacial y la estereoselectividad. Se cree que la activación involucra una reestructuración del sitio activo a través de cambios conformacionales que requieren la presencia de gotas de aceite en agua. En la Figura 6, se muestra la estructura en forma de cintas de la lipasa de *Mucor miehei*, en rojo se indica el lid que cubre el centro activo [28, 67]

Figura 6. Estructura secundaria de la conformación inactiva de la lipasa de *M. miehei*



Fuente: Peters G. et al. Protein engineering. Vol. 10, No. 2 (1997); p. 149-158

Para su aplicación industrial se emplean técnicas in situ, cultivando el microorganismo deseado en el medio con un sustrato disponible o por aplicación ex situ usando lipasas comerciales purificadas, método particularmente empleado en la producción de químicos finos, donde se requieren lipasas inmovilizadas. En el campo de biotecnología se ha prestado mucha atención al uso de lipasas de origen microbiano y aunque se han usado varias cepas en

su producción, las fuentes más comunes son la *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Rhizopus sp.* [28, 67].

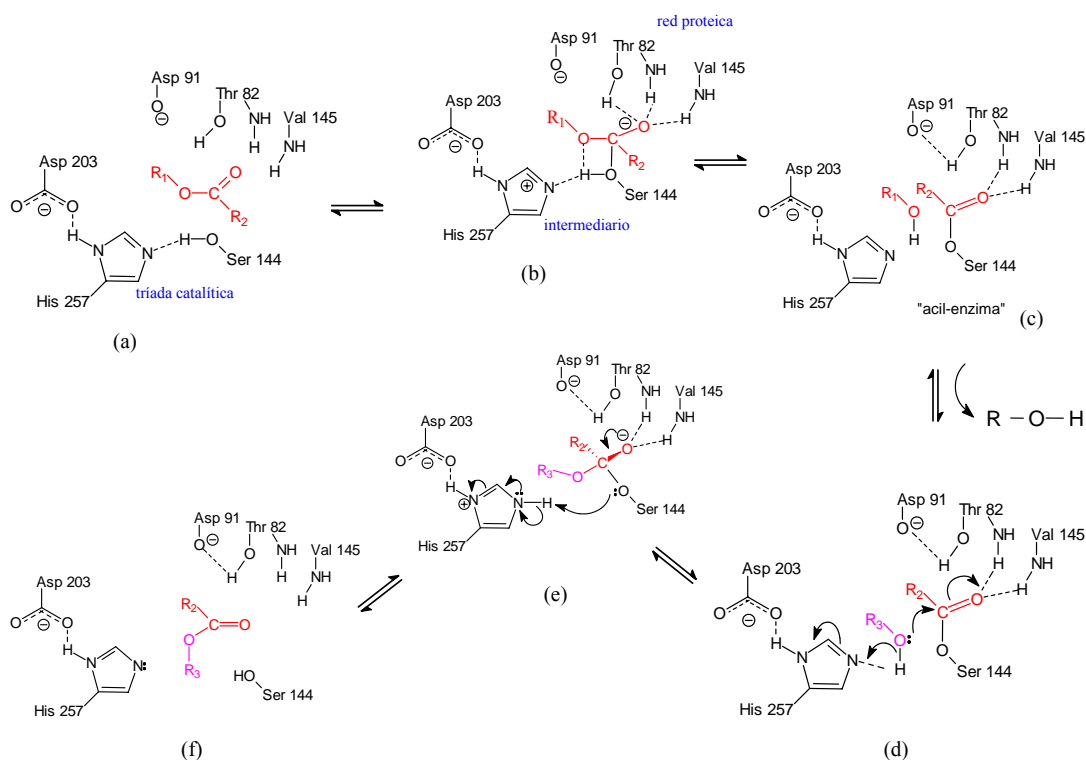
**1.4.2 Mecanismo de acción.** El sitio activo de las lipasas esta conformado por una tríada de aminoácidos ligeramente ocultos en la red proteica, pero accesible al sustrato para permitir la catálisis de sustituciones nucleofílicas como la hidrólisis o síntesis de ésteres. La triada catalítica esta formada por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico (o glutámico) [39].

El mecanismo de hidrólisis admitido se muestra en la Figura 7. El grupo hidroxilo de la serina se activa inicialmente por una sucesión de desplazamientos de cargas eléctricas las cuales afectan la triada (a), proporcionando una poderosa actividad como nucleófilo al grupo hidroxilo. Uno de los pares electrónicos del oxígeno, atacan al carbono  $sp^2$  del enlace éster del sustrato para formar un intermediario tetraédrico oxianiónico el cual es estabilizado a través de los puentes de hidrógeno con los grupos NH de la red proteica (b).

El retorno del par de electrones de carga negativa para formar el doble enlace CO, conlleva a la liberación del radical alcoxi, el cual toma el protón del ión imidazolio para formar un alcohol libre que es expulsado hacia fuera del hueco catalítico (c). La cadena de acilo permanece ligada a través de un enlace covalente con la serina para formar la acilenzima. Este intermediario es atacado entonces por una molécula de agua o alcohol (d) de acuerdo al mismo mecanismo de sustitución nucleofílica, originando un segundo intermediario tetraédrico (e) el cual se rompe en seguida para liberar el ácido carboxílico o el éster y al mismo tiempo la enzima recobra su estado original (f).

En el caso de la síntesis de ésteres, los ácidos carboxílicos se enlazan rápidamente al hidroxilo de la serina liberando una molécula de agua la cual es atrapada por la fuerza de los puentes de hidrógeno de la proteína. La acilenzima es entonces atacada por una molécula de alcohol haciendo el rol de nucleófilo a través de uno de los dos pares electrónicos del átomo de oxígeno, dando lugar a otra molécula de éster.

Figura 7. Mecanismo de acción de las lipasas en la hidrólisis de TAG's



En el caso de intercambios de acilo entre diferentes ésteres, la reacción procede a través de un mecanismo de hidrólisis y síntesis sucesivas. El agua es necesaria para todos los tipos de transferencias de acilo aún cuando no sea visible en la reacción. Suficiente agua debe estar presente en la red proteica para asegurar la estructura espacial activa y para alcanzar la actividad acuosa termodinámicamente óptima [39].

**1.4.3 Aplicaciones.** Las lipasas son una excelente alternativa como catalizadores en las técnicas orgánicas clásicas para la transformación selectiva de moléculas complejas. Poseen características que favorecen su uso como biocatalizadores e imparten especificidad a una reacción determinada. Por otra parte, el uso de enzimas puede disminuir reacciones colaterales y simplificar los problemas de separación. Los procesos catalizados por lipasas ofrecen menor consumo energético y un bajo nivel de productos de desecho.

Las lipasas se utilizan en la industria alimenticia, en aplicaciones biomédicas, como biosensores, en la obtención de pesticidas, fabricación de detergentes, en la industria del

cuero, en manejo de desechos ambientales, y en la industria de perfumes y cosméticos, entre otras. El campo de aplicación más apreciado se enfoca en la producción de químicos finos de alto valor especialmente en usos alimenticios ya que se consideran derivados naturales y presentan alta demanda comercial [28, 67, 75, 96].

**1.4.4 Lipasas inmovilizadas.** A pesar de las claras ventajas mencionadas en el empleo de lipasas, por algún tiempo su uso no fue generalizado en los procesos industriales debido a que eran inestables en las condiciones de trabajo y parcialmente solubles en agua, ocasionando problemas en la separación de productos y en su reutilización. A partir del concepto de inmovilización estos inconvenientes se han superado permitiendo un creciente uso de las enzimas en procesos biotecnológicos [4].

La inmovilización es un procedimiento en el cual se confina la enzima en una región definida del espacio para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser usadas repetidamente. Esta definición se ha ampliado estableciendo que la inmovilización es un proceso donde se restringen completa o parcialmente los grados de libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos y células por su unión a un soporte [4].

La inmovilización presenta como ventajas el aumento en la estabilidad de la enzima, resistencia a factores térmicos o químicos, posibilidad de reutilización y empleo de reactores empacados. Como inconvenientes presenta la alteración en la conformación de la enzima ocasionando pérdida de actividad y adicionalmente el costo de preparaciones inmovilizadas es mayor que el de enzimas nativas.

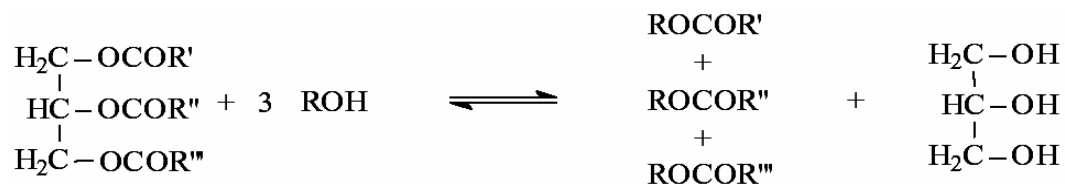
Los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes grupos: aquellos que emplean retención física de la enzima a un soporte (por atrapamiento en matriz, microencapsulación o usos de membranas semipermeables) y los métodos que emplean unión química al soporte (adsorción, unión iónica, unión covalente, y entrecruzamiento), los cuales se discuten ampliamente en diversos libros y publicaciones [12, 87, 99]

## 1.5 REACCIONES DE TRANSESTERIFICACION

**1.5.1 Generalidades.** Transesterificación es el término usado para describir un conjunto importante de reacciones orgánicas donde un éster es transformado en otro a través de un intercambio de grupos acilo. La reacción procede por simple mezcla de los reactivos pero requiere el uso de un catalizador para su rápida consecución [66, 78].

Las reacciones de transesterificación se clasifican en tres grupos de acuerdo con la clase de sustratos empleados: interesterificación (éster + éster), alcoholólisis (éster + alcohol) y acidólisis (éster + ácido). Generalmente en las publicaciones de química orgánica se considera el término transesterificación como sinónimo de alcoholólisis, por tanto, en adelante se emplean los dos términos sin distinción. La reacción general se muestra en la Figura 8, donde una molécula de TAG reacciona con 3 moléculas de alcohol produciendo tres moléculas de ésteres y una de glicerol [28].

Figura 8. Reacción general de transesterificación (alcoholólisis)

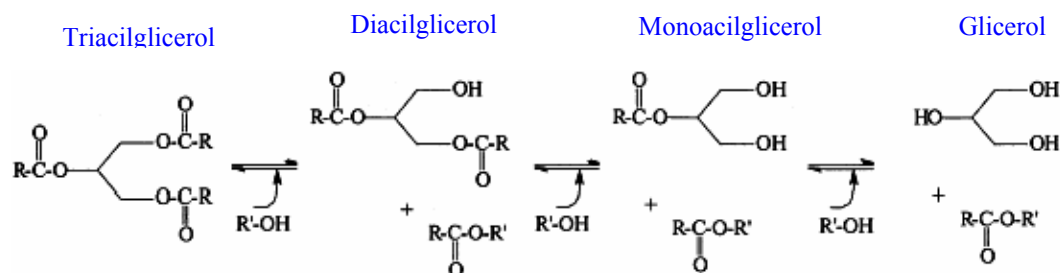


Numerosos investigadores han estudiado a fondo la reacción de alcoholólisis y la forma de optimizar las variables que influyen en ella, siendo las más importantes la temperatura, relación entre sustratos, tipo y concentración de catalizador, velocidad de agitación y pureza de reactivos. [8, 9, 21, 35, 53, 71, 84].

**1.5.2 Sustratos.** Debido a que la mayor parte de las síntesis se enfocan a la producción de ésteres metílicos, etílicos, propílicos o butílicos, las reacciones de transesterificación más frecuentes se llevan a cabo utilizando alcoholes lineales de bajo peso molecular y aceites y grasas vegetales o animales como fuente de triacilglicerol. El uso de los sustratos depende de los productos que se deseen obtener.

Se realiza la producción de ésteres a partir de aceites vegetales con el fin de emplearlos como materia prima para fabricación de oleoquímicos, agentes aromatizantes o biocombustibles, por esta razón, en este documento se describe principalmente el uso de aceites vegetales y animales. La reacción de transesterificación de aceites transcurre en tres etapas de equilibrio, las cuales se muestran en la Figura 9 [18].

Figura 9. Reacción de alcoholólisis en triacilglicérol



EL PKO y CNO se han empleado exitosamente en la alcoholólisis para la producción de biodiesel. La grasa y el sebo animal también se han empleado en la producción de ésteres. El tipo de aceite empleado no parece afectar considerablemente los rendimientos; sin embargo, su relación molar con el alcohol empleado presenta un efecto acentuado sobre el catalizador, el rendimiento y la velocidad de reacción [62, 97, 103].

Se destaca el uso de aceites de cocina reciclados los cuales debido a su bajo costo hacen más económico el proceso, sin embargo, pueden generar inconvenientes por la presencia de materiales sólidos, agua y ácidos grasos libres, inactivando o envenenando el catalizador, disminuyendo el rendimiento y haciendo necesario un proceso de purificación adicional [98, 100].

El tipo de alcohol empleado y su concentración en el medio presenta un fuerte efecto sobre la enzima y sobre el rendimiento de los ésteres. Esto puede explicarse por dos razones fundamentales: la polaridad del alcohol y su solubilidad con el aceite. Alcoholes polares como el metanol y etanol causan un efecto de inactivación en las enzimas ya que afectan su microambiente y extraen el agua necesaria para mantener su actividad; alcoholes superiores como el propílico o butílico no presentan este comportamiento tan acentuadamente [29, 82].

La solubilidad es importante para un contacto íntimo entre los sustratos y la enzima. Usualmente los alcoholes más polares presentan baja solubilidad en el aceite, cuando se utiliza metanol y etanol generalmente es necesario el uso de solvente que permita un mejor contacto entre los sustratos. Los solventes preferiblemente deben ser no polares, insolubles en agua y poco tóxicos como pentano, hexano o heptano. Las reacciones sin empleo de solventes son importantes debido a su simplicidad, seguridad y ahorro en procesos de purificación [29, 101].

Se han empleado con éxito aceite de girasol y sebo animal en alcoholisis con varias lipasas como catalizadores, obteniendo rendimientos entre el 70% y 90%. El uso de grasas recicladas ha sido evaluado empleando etanol comercial del 95% de pureza obteniendo rendimientos hasta del 80%. También se ha estudiado la transesterificación con aceite de colza y girasol empleando metanol y etanol absoluto con rendimientos hasta del 98% [18, 100, 82, 97, 79] Con PKO y etanol los rendimientos han sido de hasta el 72% mientras que el metanol bajo iguales condiciones solo permite rendimientos del 15% [1].

**1.5.3 Catalizadores.** La reacción de alcoholisis puede ser efectuada en presencia de catalizadores químicos o enzimáticos. También es posible realizarla bajo condiciones de alta presión y temperatura utilizando fluidos supercríticos. Los catalizadores se clasifican de acuerdo a su naturaleza química [78].

- **Químicos.** Entre los más empleados se encuentran los ácidos sulfónicos y sulfúrico; con los cuales se obtienen altos rendimientos en los procesos industriales pero en reacciones de varias horas y a temperaturas cercanas a 100°C. Con ellos pueden utilizarse aceites de elevada acidez ya que se esterifican los ácidos grasos libres. La principal desventaja es su poder de corrosión, deteriorando los reactores y aumentando el costo en materiales [66].

Los catalizadores básicos inorgánicos permiten reacciones más rápidas en comparación con los ácidos, son menos corrosivos y más empleados en procesos industriales; entre ellos se emplean con frecuencia alcóxidos, hidróxidos y carbonatos de sodio y potasio. Su uso requiere la ausencia de agua libre en los sustratos para evitar la hidrólisis y formación de jabones. Además son más costosos y sensibles a las impurezas presentes en el medio [78, 84].

Los alcóxidos e hidróxidos se utilizan en concentración de 1% con relación al peso de reactivos y se ha determinado que la relación molar óptima alcohol/aceite es de 6/1, obteniéndose rendimientos del 95% y conversiones totales en menos de 20 minutos. La desventaja de los ácidos y bases inorgánicas es la dificultad en la recuperación y reutilización del catalizador [9, 21, 27, 53,64].

También se utilizan bases orgánicas, entre las cuales se destacan las aminas, amidinas, guanidinas y nitroguanidinas. Su ventaja es la posibilidad de atraparlas en polímeros orgánicos permitiendo su reutilización. La desventaja es su menor eficiencia comparada con las bases inorgánicas y la elevada desorción de los polímeros donde se inmovilizan. Las zeolitas también se han propuesto como catalizadores, pero los tamaños de poro son muy pequeños para permitir el ingreso de moléculas grandes como los triacilgliceroles, presentando problemas de difusión [66, 78].

- **Enzimáticos.** El principal inconveniente al emplear lipasas es su elevado costo, sin embargo, actualmente son más accesibles debido a los métodos de ADN recombinante y otros avances biotecnológicos. Las lipasas en reacciones de transesterificación no solo se emplean para la producción de ésteres sino además en la fabricación de sustitutos de grasas, lípidos estructurados, fármacos, compuestos quirales, carbonatos orgánicos, compuestos biológicamente activos y purificación de ácidos grasos poliinsaturados [30].

En la bibliografía científica se han descrito los mecanismos de acción y las múltiples aplicaciones de lipasas en la producción de ésteres, analizando las variables que influyen en los procesos de modificación estructural de grasas y aceites. Las lipasas se han empleado exitosamente en la producción de ésteres grasos, mono, di y triacilgliceroles, con excelentes resultados [23, 30, 31, 35, 41, 63, 76, 91, 98].

Las reacciones con lipasas inmovilizadas se pueden llevar a cabo en sistemas sin emulsión (a diferencia de enzimas sin inmovilizar) ya que la superficie del soporte reemplaza la interfase agua-liquido necesaria para su activación. En lipasas inmovilizadas como Lipozyme<sup>®</sup> IM, el soporte (una resina de intercambio aniónica) permite retener el agua necesaria para su buen desempeño sin necesidad de adición de agua [8]. Se ha confirmado que la termoestabilidad

de las lipasas depende de factores como su origen, el tipo de solvente, el tipo de sustratos, el contenido de agua y la forma de inmovilización [36, 52, 76].

La especificidad de una lipasa definida en reacciones hidrolíticas puede ser totalmente diferente en reacciones de esterificación debido al tipo de reacción o al cambio en su microambiente. Se ha comprobado que la actividad hidrolítica no está relacionada directamente con la actividad en la esterificación, por el contrario, son totalmente independientes [101].

Las lipasas inmovilizadas de *Mucor miehei* (Lipozyme<sup>®</sup> IM) y *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup>) son algunas de las más empleadas y reportadas en la literatura debido a su creciente disponibilidad, mejorada estabilidad y adecuada actividad catalítica tanto en la síntesis como en la hidrólisis de ésteres. Estas lipasas han sido probadas y estudiadas en la preparación de diversos productos [29, 83].

Lipozyme IM se ha empleado en la producción de ésteres grasos metílicos, etílicos y butílicos a partir de aceites vegetales como soya, colza o cártamo, obteniendo rendimientos superiores al 80%, llevando a cabo su reutilización sin disminución considerable de la actividad. La lipasa inmovilizada *Candida antarctica* también ha probado su efectividad en la síntesis de ésteres metílicos y etílicos empleando aceites vegetales refinados y reciclados [16, 18, 62, 80, 82, 98].

Se ha evaluado el efecto que tiene la inmovilización sobre diferentes lipasas en reacciones de acidólisis, la inmovilización ha mejorado considerablemente su estabilidad y ha hecho posible su uso prolongado. La lipasa de *M. miehei* posee una alta actividad hidrolítica y esterificante haciéndola ventajosa en la alcoholólisis debido a los pasos de hidrólisis y síntesis sucesivos en su mecanismo [13].

Lipasas de *Mucor miehei*, *Ps. cepacia*, *Candida antarctica* y *Candida rugosa* se han usado para la producción de ésteres, encontrando que la inmovilización ocasiona una alteración en la selectividad con respecto a la lipasa en estado nativo. Las lipasas de *Mucor javanicus* y *Ps. fluorescens* inmovilizadas en caolinita porosa se han empleado en la transesterificación de

aceite de cártamo y trioleína con alcoholes primarios, presentando alta actividad catalítica y estabilidad mejorada con respecto a sus análogas sin inmovilizar [45, 52].

- **Fluidos supercríticos.** La producción de ésteres metílicos también se lleva a cabo por un proceso de alcoholísis con metanol supercrítico, obteniendo alto rendimiento y pureza de productos. Según los cálculos, el uso de energía y los costos de producción son competitivos con aquellos métodos comúnmente usados [50].

**1.5.4 Variables de proceso.** Para hacer viable industrialmente la producción enzimática de ésteres es necesario estudiar las variables que afectan el proceso y determinar los valores en los cuales se presentan altos rendimientos, mayor aprovechamiento de materia prima, y reducción de gastos. Estas variables determinan la eficiencia del proceso y generalmente su importancia es igual en todas las reacciones de transesterificación sin importar el catalizador empleado.

Las variables con mayor influencia en la transesterificación enzimática son la temperatura, relación molar alcohol/aceite, concentración del biocatalizador y la pureza de los reactivos. El efecto de cada variable en las reacciones se analiza separadamente [62, 93].

- **Tiempo de reacción.** En un proceso industrial se requieren tiempos de reacción cortos para competir con catalizadores básicos que efectúan conversiones completas en menos de una hora. Los procesos enzimáticos son más lentos debido a la naturaleza del catalizador, por tanto, es necesario emplear varias horas para obtener altos rendimientos.

En los reportes con empleo de lipasas, los tiempos de reacción van de 3 hasta 72 horas, por tanto los trabajos se enfocan en disminuir el tiempo consiguiendo una máxima producción haciendo uso de un adecuado diseño experimental y su análisis [62, 90, 100].

- **Temperatura.** Las lipasas en estado nativo son sensibles a la desnaturalización a temperaturas mayores de 40°C, mientras que el rango de acción óptima en lipasas inmovilizadas está determinado dentro de 40-70°C. La mayoría de trabajos emplean este rango dentro del cual la variación en la producción de ésteres no es significativa. Aunque las

lipasas inmovilizadas pueden soportar temperaturas hasta de 130°C, es recomendable trabajar a temperaturas bajas para conservar su estabilidad por más tiempo [89].

En casi todos los trabajos reportados usando Lipozyme o Novozyme se trabaja a temperaturas de 50 a 55°C, sin importar el tipo de aceites empleados. Cuando se utilizan solventes polares el efecto de la temperatura es aún más intenso y se refuerza si hay agua presente en el medio [31, 35, 82, 89,100].

- **Agitación.** Las lipasas, inmovilizadas o no, son sensibles a fuerzas de cizalla creadas por empleo de agitación magnética o mecánica. Si este esfuerzo es excesivo propicia la fractura de los soportes poliméricos y la mayor desorción de la enzima. La mayoría de autores emplean agitación orbital lo suficientemente fuerte para evitar los problemas por difusión y transferencia de masa, pero no tan grande como para ocasionar su inactivación.

La velocidad depende del equipo utilizado ya que las escalas varían, sin embargo, comúnmente se reportan velocidades de 200 a 400 rpm empleando agitación orbital. Una mayor velocidad es necesaria si los sustratos no son miscibles, caso en el cual, la agitación se vuelve un factor con gran influencia. Si los sustratos son miscibles y presentan baja viscosidad, la velocidad de agitación no presenta mayor relevancia. En la producción a escala industrial es necesario el uso de agitación mecánica empleando propelas de diferentes tipos [4, 64].

- **Concentración de sustratos.** El aceite por su naturaleza química no presenta una gran influencia ya que esta conformado por TAG's no polares, sin embargo, el estado físico de los aceites y su miscibilidad con el alcohol determina la viscosidad del medio e influye en la conversión. Generalmente las reacciones se llevan a cabo a más de 40°C, temperatura a la cual los aceites y grasas se presentan en estado líquido, facilitando el contacto entre los sustratos [32].

El metanol debido a su alta polaridad presenta un efecto inactivante irreversible sobre las lipasas debido a la extracción del agua esencial de hidratación en la enzima. Este factor debe tenerse en cuenta cuando se desea utilizar un exceso para desplazar el equilibrio de la reacción: es más grande el efecto inactivante que el efecto del equilibrio. Varios autores

resuelven este inconveniente adicionando el metanol en dos o tres etapas de manera que evitan su separación del aceite; como consecuencia aumentan los tiempos de reacción ya que el equilibrio se hace menos favorable hacia la producción de ésteres [82, 98, 101, 104].

El etanol, propanol y n-butanol, también son polares pero en menor grado a medida que la cadena carbonada se hace mayor, su solubilidad también aumenta con la cadena de carbonos y por tanto presentan mejor contacto con el aceite y la enzima. Se ha observado que los alcoholes ejercen un daño permanente en la enzima si no se solubilizan bien con el aceite por ello la mayoría de autores emplean una relación molar alcohol/aceite 1/3 evitando con ello la presencia de alcohol o aceite remanente en el medio. Las mejores conversiones se efectúan con alcoholes primarios que con secundarios, al parecer debido a efectos estéricos. [30, 31, 40].

- **Concentración de enzima.** En procesos industriales se requiere el empleo de la mínima cantidad de catalizador, por tal razón, un objetivo al trabajar con enzimas es conseguir reacciones rápidas y completas utilizando cantidades similares a las empleadas en la catálisis con bases iónicas, es decir del 0.5 a 1% peso de enzima con relación al peso de sustratos.

La concentración de la enzima esta relacionada fuertemente con la velocidad inicial de reacción según se describe en el esquema cinético de Michaelis-Menten. Al aumentar la concentración se predice un aumento en la velocidad inicial de reacción hasta cierto límite donde se saturan los sitios activos. Así, el empleo de una concentración mayor de enzima en cierto intervalo favorece la velocidad y por tanto disminuye el tiempo de reacción. Empleando lipasas inmovilizadas este factor es determinante desde el punto de vista económico [58].

Debido al alto costo de las enzimas inmovilizadas no es probable el uso de concentraciones mayores del 12% en peso con relación a los sustratos, no obstante concentraciones menores del 1% presentan velocidades iniciales bajas para llegar al equilibrio. La gran mayoría de trabajos buscan la manera de optimizar esta variable en un rango de 0.5 - 12% de enzima, siendo deseable un porcentaje bajo pero sin sacrificar la productividad [35, 57, 82, 100].

▪ **Contenido de agua y actividad acuosa.** La hidratación es muy importante para mantener la estructura tridimensional y actividad de enzimas. El término “actividad acuosa” ( $A_w$ ) describe en el equilibrio, la cantidad de agua disponible para la hidratación de la enzima y su microambiente incluido el soporte; un valor de unidad indica agua pura y cero indica la ausencia total de moléculas de agua. Por otra parte, el contenido de agua (*bulk water*), se refiere a la concentración del agua en todo el conjunto del sistema, es decir en la mezcla de sustratos y solvente [20, 104].

Las lipasas necesitan una pequeña cantidad de agua para retener su conformación tridimensional aun cuando esté enlazada a un soporte. El agua contribuye a la integridad estructural, a mantener la polaridad del sitio activo y la estabilidad de la red proteica. Incluso en sistemas que trabajan con solventes y/o sustratos orgánicos, la actividad catalítica depende del agua presente en el sistema. Para estudiar la influencia de factores como el solvente o el soporte de la enzima, es recomendable realizar experimentos a una actividad acuosa fija, evitando así efectos indirectos debido a las variaciones en la hidratación de la enzima [101].

Los trabajos para determinar el efecto del agua son diversos. Se ha determinado la actividad acuosa y su efecto en varias lipasas, entre ellas *M. miehei* y *C. antarctica*, encontrando que la  $A_w$  afecta el equilibrio hidrólisis-síntesis, la hidratación de la enzima, su plasticidad y actividad catalítica. La  $A_w$  también modifica ligeramente la selectividad de la enzima [52].

La técnica de radiomarcado isotópico se ha usado para medir cuantitativamente la desorción del agua enlazada a una enzima cuando se pone en contacto con un medio no acuoso, encontrando que solventes polares retiran gran parte del agua, disminuyendo su actividad. En promedio, el metanol desorbe hasta el 62 % del agua de una enzima, aunque este efecto depende de la enzima y del solvente empleado [37].

Estudios detallados de la actividad de Lipozyme a bajas actividades acuosas han concluido que requiere una mínima cantidad de agua para mantener su conformación activa, es termoestable en un amplio intervalo y posee alta retención de su actividad catalítica a  $A_w$  de

solo 0.0001. No requiere la adición de agua exógena ya que la resina de soporte mantiene su capa hidratante y hace posible su uso en solventes orgánicos sin perder su actividad. [20, 31, 92].

## **1.6 MEJORAMIENTO DE PROCESOS MEDIANTE EL DISEÑO EXPERIMENTAL**

La experimentación es una parte importante en el aprendizaje de la forma como trabajan los sistemas y procesos. La validez de las conclusiones que se obtienen de un experimento depende de la manera como se efectúe, por tanto, el diseño del experimento juega un papel importante en la solución eventual del problema que lo motivó. El diseño experimental es una herramienta útil para mejorar el rendimiento de un proceso o para el desarrollo de nuevos procesos y productos [59].

Entre los varios tipos de diseños y formas de analizarlos, se encuentra la metodología de superficie de respuesta (RSM), que comprende un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas que se emplean para el modelado y análisis donde la respuesta de interés está influenciada por diversas variables y el objetivo es optimizar esta respuesta [10, 54].

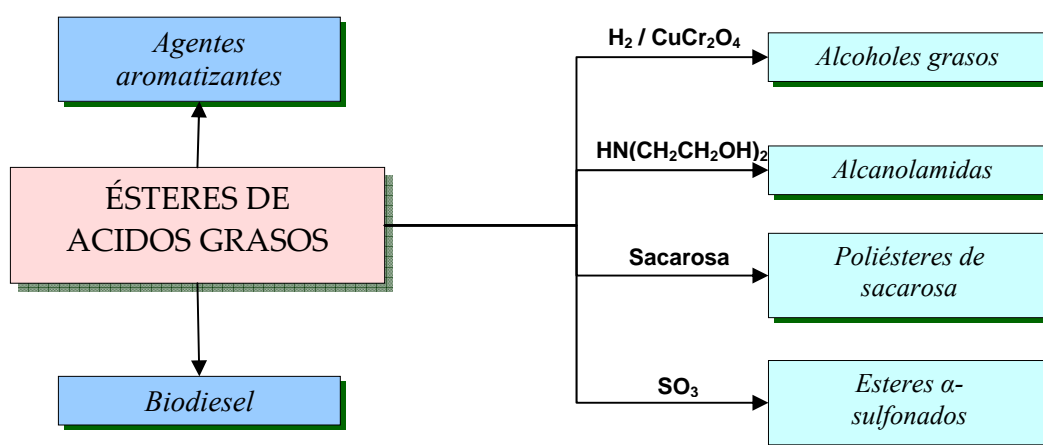
Varios autores han empleado esta metodología en la optimización de reacciones de transesterificación. Se ha usado la RSM para optimizar la producción de ésteres de grasas con ayuda de un diseño central compuesto estudiando las variables tiempo, nivel de lipasa y relación entre sustratos. En el estudio de la transesterificación de aceite de colza se ha aplicado RSM ya que el tradicional método COST no proporciona una adecuada descripción del proceso ni tiene en cuenta las interacciones entre las variables [90, 100].

Para efectuar el diseño adecuado se deben descartar aquellas variables de las cuales ya se tenga mayor conocimiento o experiencia previa según la revisión bibliográfica. Con propósitos de optimización se ha empleado la RSM para acidólisis empleando lipasas y determinando con esta técnica las condiciones óptimas. También se ha aplicado el diseño factorial y la RSM para optimizar la producción enzimática de biodiesel [77, 93].

## 1.7 ÉSTERES GRASOS Y SUS APLICACIONES

Los ésteres de ácidos grasos, principalmente metílicos, etílicos y butílicos presentan numerosas aplicaciones en todas las áreas de la industria alimenticia y oleoquímica (Figura 10). Directamente son reconocidos como biodiesel y agentes aromatizantes; indirectamente se emplean como materia prima para fabricación de productos químicos importantes, los cuales se describen continuación [43].

Figura 10. Áreas de aplicación de los ésteres de ácidos grasos



**1.7.1 Biodiesel.** Según la ASTM, el término biodiesel se utiliza para designar ésteres monoalquílicos de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos renovables (grasas y aceites) para ser utilizados en motores Diesel. El biodiesel está registrado en la EPA como un combustible y un aditivo para combustible cumpliendo con los requisitos del “*Clean Air Act*” de 1990. El biodiesel hace parte de los combustibles limpios junto con el etanol, metanol, gas natural, propano, electricidad y gasolina oxigenada, los cuales tienen en común su baja emisión de contaminantes. En 1998 la ASTM aprobó una normatividad estándar para el biodiesel (ASTM PS 121) y desde entonces la EPA ha adoptado este estándar [22, 95].

El biodiesel es un combustible seguro, procede de recursos renovables, no es tóxico y es tan biodegradable como el azúcar (se biodegrada el 98,3% en solo 21 días). El CO<sub>2</sub> emitido en su combustión se reabsorbe en los cultivos de oleaginosas, por tanto no contribuye al aumento del efecto invernadero. Al emplearlo en motores diesel se disminuyen las emisiones

de monóxido de carbono, partículas sólidas e hidrocarburos, además no se producen óxidos de azufre, ni compuestos aromáticos [94, 103].

En Europa se emplea como combustible principalmente en Suecia, Austria, Finlandia y Portugal. Francia es el mayor productor de biodiesel a partir del aceite de colza mediante alcoholólisis química. En Alemania las leyes severas de protección ambiental exigen que las maquinas agrícolas solo usen combustibles y lubricantes biodegradables. España utiliza biodiesel para transporte público en ciudades como Valladolid y Zaragoza. En Norteamérica se usa la mezcla de 80% diesel y 20% biodiesel conocida como B20, además se producen aproximadamente 130 millones de litros de biodiesel al año el cual se emplea en autobuses, flotas navales, tránsito en aeropuertos y parques nacionales entre otros [94].

Los procesos industriales para la producción de biodiesel emplean catalizadores químicos como hidróxidos de sodio y potasio. Se destaca el proceso Henkel, a 9000 KPa y 240°C, y el proceso Lurgi a presión y temperatura ambiente. La calidad del biodiesel depende de su composición química, ya que para un adecuado desempeño como combustible no se deben encontrar en el carburante trazas de sales o de ácidos fuertes, residuos de catalizador, contenidos importantes de glicéridos parciales o de ácidos grasos libres [84].

El biodiesel se ha usado en motores diesel sin modificar y se ha comprobado que no causa deterioro significativo en comparación con el Diesel mineral. El Biodiesel es una gran alternativa a los combustibles del petróleo, algunos autores como Murphy calculan que el petróleo presentará una escasez rápida a partir del año 2020 aumentando su precio considerablemente aun cuando se descubran nuevos yacimientos, por tanto, los oleoquímicos serán los sustitutos del futuro [38, 61].

**1.7.2 Agentes aromatizantes.** Los ésteres etílicos y butílicos de ácidos grasos desde  $C_6$  a  $C_{14}$  pueden ser empleados directamente como agentes aromatizantes en productos alimenticios. El laurato de butilo, por ejemplo, es usado como agente aromático ya que naturalmente forma parte de la fragancia de frutas como la pera o albaricoque y de licores como brandy y coñac. Otros ésteres de bajo peso molecular también forman parte de aromas frutales naturales y requieren su fabricación mediante procesos enzimáticos que eviten el uso de solventes [31].

Empleando Lipozyme se han sintetizado ésteres grasos de etanol, para uso en saborizantes y fragancias. Se ha descrito también, el empleo de lipasas para fabricar ésteres de bajo peso molecular usados en alimentos, perfumes, cosméticos o productos farmacéuticos. Estos agentes, sintetizados con lipasas, son de alta demanda y pueden tener elevado precio ya que se consideran ingredientes naturales por organismos como la *Internacional Organization of the Flavor Industry* [16, 28].

**1.7.3 Solventes y productos fitosanitarios.** Los ésteres son solventes seguros y biodegradables empleados como adyuvantes agroquímicos y vectores de pulverización, los cuales poseen la propiedad de transportar materias activas a nivel de la plantas. Los solventes aromáticos comúnmente usados, a diferencia de los ésteres, son menos biodegradables, más tóxicos e inflamables. Se destaca la aplicación de ésteres como vehículos fitosanitarios para su uso en herbicidas e insecticidas reemplazando solventes como el xileno, tolueno o isofrona [43].

**1.7.4 Surfactantes.** Los surfactantes comprenden un grupo extenso de compuestos químicos usados para disminuir la tensión superficial cuando dos materiales insolubles entran en contacto, permitiendo su solubilización. Son adicionados a detergentes, alimentos, cosméticos, pinturas y productos farmacéuticos.

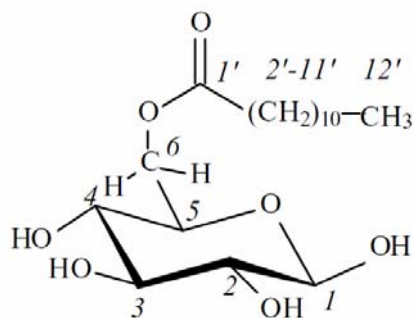
Los ésteres metílicos y etílicos se emplean como materia prima para la fabricación de surfactantes como alcoholes grasos, ésteres  $\alpha$ -sulfonados, alcanolamidas, aminas grasas, ésteres de sacarosa, alcoholes etoxilados y etoxisulfatos de alcohol. Los alcoholes y ésteres sulfonados de cadena  $C_{12}$  y  $C_{14}$  son de especial interés debido a sus mejores propiedades de detergencia [32, 48].

Las aminas grasas y sus derivados son utilizados como surfactantes catiónicos, los cuales se adsorben en gran variedad de superficies, tienen fuertes propiedades germicidas y actúan como anticorrosivos. Estos productos se utilizan en la industria de los plásticos como lubricantes internos y externos, como agentes desmoldantes, especialmente en el poliestireno ABS, PVC, polivinilacetato y resinas fenólicas [32].

Los ésteres  $\alpha$ -sulfonados son un grupo de surfactantes aniónicos que presentan propiedades detergentes iguales o superiores a los alquilbencenos lineales y se obtienen por sulfonación de ésteres metílicos o etílicos. Poseen alta resistencia a las aguas duras, son biodegradables, presentan baja toxicidad, poca tendencia a irritar la piel y se obtienen a partir de recursos renovables [44].

Los monoésteres de sacarosa se emplean como surfactantes no iónicos y emulsificantes en alimentos. El monolaurato de sacarosa (Figura 11) por ejemplo, posee actividad bacteriostática inhibiendo el crecimiento de microorganismos como el *E. coli*, es compatible con la piel y poco irritantes pudiéndose usar en cosmético. También se emplea en forma de cubierta para preservación de frutas. Generalmente se prepara por transesterificación química o enzimática de sacarosa con ésteres metílicos de ácidos grasos [74].

Figura 11. Estructura química de la 6-*O*-lauril- $\beta$ -D-glucosa



**1.7.5 Sustitutos de grasas.** Los ésteres grasos se emplean como materia prima en la producción de sustitutos de grasas no calóricos entre los cuales se destacan los poliésteres de sacarosa y los triglicéridos de cadena media. Estos productos se han desarrollado como reemplazo de grasas naturales ya que su alto consumo en la dieta se ha asociado con riesgos de obesidad y enfermedades coronarias [34].

Los poliésteres son ésteres de sacarosa con 6 a 8 ácidos grasos esterificados por reacción química o enzimática de octaacetato de sacarosa y ésteres grasos generalmente de  $C_{12}$  a  $C_{16}$ . Son sustitutos sintéticos de grasas comestibles que presentan las mismas cualidades físicas y funcionales pero con bajo o nulo poder calórico. Han sido aprobados por la FDA para su uso

en la fritura de pasabocas y presentan la ventaja de no ser metabolizados debido a que las lipasas digestivas no los hidrolizan [3].

Los triglicéridos de cadena media son parte de los lípidos estructurados y están conformados mayoritariamente por ácidos caprílico y cáprico, lo cual permite su rápida absorción y digestión con menor tendencia a acumularse en el tejido adiposo aportando más energía en su consumo. Los monoglicéridos también se emplean como emulsificantes y sustitutos de grasas en alimentos; se producen por síntesis química o enzimática en una reacción de transesterificación [3, 11, 49].

## 1.8 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

El análisis de los productos de transesterificación comprende la determinación de ésteres alquílicos, glicerol y alcohol así como mono, di y triacilgliceroles remanentes en el medio. Debido a que se presenta una mezcla compleja es necesaria una técnica instrumental adecuada que permita caracterizar y cuantificar cada componente en lo posible. Una variedad de métodos se han usado para estas determinaciones [27, 51].

Se ha empleado con éxito la cromatografía de capa fina con detector de ionización en llama (TLC/FID) usando equipos Iatroscan. Esta técnica permite la cuantificación tanto de ésteres como de acilgliceroles de alto peso molecular. Sus desventajas son el largo tiempo de análisis y la complejidad del método comparada con otros disponibles [73].

Otra técnica comúnmente empleada es la cromatografía gaseosa de alta temperatura (HTGC), aunque cabe señalar que la cuantificación de triacilgliceroles se dificulta si no se cuenta con accesorios especiales, debido a la discriminación de analitos que presenta el empleo de inyección tradicional *split* y a la alta temperatura necesaria en el análisis (más de 300°C) [2, 47, 73].

Para solucionar estos inconvenientes en la cromatografía gaseosa se emplea inyección *on column* y columnas con fases estacionarias medianamente polares de silarileno o carborano, las cuales resisten temperaturas hasta de 420°C, permitiendo la separación de ésteres y acilgliceroles por número de carbono y por instauración. También es posible determinar

glicerol y el alcohol remanente, pero generalmente se debe emplear derivación química [56, 70, 79]

La cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) es quizás la técnica más adecuada para determinar acilgliceroles. Permite cuantificar ésteres y no es necesaria la derivación, aunque no es posible la determinación de glicerol libre. Su principal inconveniente es la mayor complejidad debido al uso de solventes, y la menor reproducibilidad de las determinaciones [40, 72, 90,100].

Una técnica menos común es la espectroscopía de infrarrojo cercano usando fibra óptica, con la cual se puede monitorear el grado de conversión en la alcoholólisis directamente en el medio de reacción. También se ha empleado con éxito la resonancia magnética nuclear. De Filippis ha desarrollado un método para realizar determinaciones rápidas en la producción industrial de ésteres, en el cual correlaciona la viscosidad y densidad del medio con su contenido de ésteres. Sin embargo debe hacerse una calibración inicial por cromatografía de gases y no es aplicable cuando el porcentaje de ésteres es menor del 45% [15, 27].

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MATERIALES

El aceite de palmiste refinado grado comestible RDB fue suministrado por C.I. Santandereana de Aceites –C.I. SACEITES S.A.-. Las enzimas lipasas 1,3-estereoespecíficas de *Mucor miehei* (Lipozyme<sup>®</sup> IM) y *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme<sup>®</sup> TL) se adquirieron a Novozymes. Los alcoholes metanol, etanol, etanol comercial, 2-propanol y butanol fueron de grado reactivo y anhidros excepto el etanol comercial con una pureza del 96%. Los demás reactivos empleados fueron grado analítico y los solventes necesarios para los análisis grado GC o HPLC.

### 2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

**2.2.1 Alcohólisis enzimática.** En todas las reacciones de alcohólisis se emplearon como sustratos aceite de palmiste (PKO) y uno de los siguientes alcoholes: metanol, etanol, etanol comercial, 2-propanol y butanol. En tubos de ensayo de 50 mL provistos con tapa se mezclaron el aceite de palmiste (1-2 g) y el alcohol seleccionado (0,2-1 mL) dependiendo de la relación de sustratos indicada en el diseño experimental. Esta mezcla se incubó en un baño termostataado a la temperatura evaluada y empleando agitación orbital a 300 rpm (Figura 12).

Luego de 15 minutos de agitación se agregó la lipasa inmovilizada (20-100 mg). A partir de este momento se inició el conteo de tiempo y una vez transcurrido, la enzima se recuperó del producto haciendo pasar la mezcla a través de un filtro de papel (franja negra). El filtrado se recogió en tubo de ensayo, se eliminó cualquier residuo de agua adicionando sulfato de sodio anhidro y se filtró nuevamente. Del segundo filtrado obtenido se pesaron con exactitud entre 10-15 mg para la determinación de sus componentes (ésteres grasos y acilgliceroles) por cromatografía de gases.

Figura 12. Montaje empleado para efectuar la reacción de alcoholólisis



▪ **Selección del alcohol.** Para iniciar la búsqueda de las condiciones óptimas de reacción, se realizó un diseño de *screening* con los diferentes alcoholes, seleccionando el más adecuado con base en parámetros de solubilidad y alto rendimiento obtenido. Se efectuaron 8 experimentos catalogados desde A hasta H. Dentro de este diseño también se evaluó el efecto del hexano al ser aplicado como solvente. Las condiciones empleadas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de reacción en el diseño de *screening* con diferentes alcoholes

Experimento	Alcohol <sup>a</sup>	Relación molar alcohol/aceite	Aceite de palmiste (g)	Solvente
A	Metanol	3	2,3077	No
B	Metanol	1,5	2,3059	No
C	Metanol	3	2,3076	Hexano <sup>c</sup>
D	Etanol	3	1,6115	No
E	2-propanol	3	1,2213	No
F	Butanol	3	1,0197	No
G	Metanol	1,5	2,3258	Hexano <sup>c</sup>
H	Etanol <sup>b</sup>	3	1,5787	No

a: alcoholes absolutos excepto en experimento H, b: Etanol comercial al 96%, c: adicionado en cantidad de 200% del volumen de PKO

En cada una de los experimentos (A-H) se utilizó el procedimiento general descrito en 2.2.1. manteniendo fijas las condiciones de tiempo (6 h) y cantidad de lipasa inmovilizada (4% del peso del aceite), seleccionadas de acuerdo con los estudios reportados por Nelson [62]. En los productos obtenidos se analizó el contenido en ésteres y triacilgliceroles de acuerdo con el procedimiento descrito en los métodos de análisis numeral 2.3.6.

▪ **Determinación de las condiciones óptimas.** En la etapa de optimización de variables se empleó etanol absoluto y aceite de palmiste como sustratos. El etanol se eligió de acuerdo a los resultados obtenidos en el *screening*, teniendo en cuenta los parámetros mencionados. Las razones de esta elección se discuten en la sección de análisis de resultados. El diseño experimental permitió evaluar las variables con mayor influencia y sus interacciones sobre la obtención de ésteres. Se empleó un diseño central compuesto rotatorio de cubo + estrella (CCRD), de tres niveles por tres variables, usando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0 para Windows.

Las variables independientes o factores estudiados fueron: cantidad de enzima,  $X_1$  (% peso con respecto al aceite); relación alcohol/aceite,  $X_2$  (mol/mol) y tiempo de reacción,  $X_3$  (horas). Los niveles empleados para cada variable se presentan en la Tabla 3. Todas las reacciones del diseño fueron hechas en un medio libre de solvente. La variable dependiente o de respuesta ( $Y_1$ ), se definió como el porcentaje en peso de ésteres etílicos (ETE's) totales en la mezcla final de reacción. Cada experimento se realizó por duplicado en todos los puntos obteniendo un total de 34 experimentos (Tabla 4). Adicionalmente se midió el porcentaje de ácidos grasos libres en los productos, el cual se usó como una respuesta secundaria o covariable de respuesta ( $Y_2$ ).

En el estudio se mantuvieron constantes parámetros tales como temperatura (55°C) y velocidad de agitación orbital (300 rpm). No se adicionó agua al medio. Todas las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento general para alcoholólisis (numeral 2.2.1). Los intervalos en los cuales se evaluaron las variables de estudio así como los valores de los parámetros que se mantuvieron constantes se eligieron con base en las investigaciones hechas por Abigor [1], Iso [45], Mittelbach [57], Nelson [62] y Selmi [80].

Tabla 3. Variables y niveles del diseño de optimización

Variable independiente	Símbolo	Códigos de los niveles		
		-1	0	1
Cantidad de enzima (% en peso de PKO)	X <sub>1</sub>	2	4	6
	X <sub>2</sub>	3	5	7
Relación alcohol/aceite (mol/mol)	X <sub>3</sub>	3	6	9

Tabla 4. Puntos del diseño CCRD

Experimento	Nivel de la variable (codificado) <sup>§</sup>		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	1	-1	-1
2	1	1	1
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	1,68179*
6	-1	-1	-1
7	0	-1,68179*	0
8	0	0	0
9	-1	1	-1
10	1	1	-1
11	-1,68179*	0	0
12	1	-1	1
13	-14	-1	1
14	1,68179*	0	0
15	-1	1	1
16	0	0	-1,68179*
17	0	1,68179*	0

\* Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad.

§ X<sub>1</sub> = (%enzima real-4)/2, X<sub>2</sub> = (relación molar etanol/aceite-5)/2, X<sub>3</sub> = (tiempo-6)/3

- **Evaluación y seguimiento a escala preparativa.** Empleando las condiciones favorables encontradas para la producción de ésteres grasos según el diseño CCRD, se efectuó la alcoholólisis a escala preparativa. Adicionalmente se realizó un seguimiento de la reacción en el tiempo con el fin estudiar la transformación de los sustratos.

En un reactor de vidrio, cilíndrico y cerrado (20 cm. altura x 7,5 cm. diámetro) se mezclaron 100g de aceite de palmiste y 25 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó en un baño termostataado a una temperatura de 55°C y se sometió a agitación mecánica con ayuda de una propela marina de tres aspas a velocidad de 200 rpm. Luego de 15 minutos de agitación se adicionaron 6 g de enzima inmovilizada. De esta mezcla se tomó una muestra cada hora durante seis horas en total, dejando decantar antes la enzima por 40 segundos. Cada muestra tomada se filtró y secó empleando sulfato de sodio anhidro. Del filtrado se pesaron 10 mg en vial de 1 mL para su respectivo análisis por cromatografía de gases.

- **Evaluación de la estabilidad.** En esta etapa se evaluó el efecto del reuso de la enzima. En el reactor de vidrio se mezclaron 100g de aceite de palmiste y 25 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó en un baño termostataado a una temperatura de 55°C y se sometió a agitación mecánica con ayuda de una propela marina a velocidad de 200 rpm. Luego de 15 minutos de agitación se adicionaron 6g de enzima inmovilizada. La reacción se dejó transcurrir por 3 horas. Se retiró el producto, se filtró la enzima y se utilizó nuevamente en otro sistema idéntico (*Batch*) adicionando los sustratos previamente mezclados y acondicionados a la temperatura de trabajo.

Se determinó el porcentaje de ésteres y acilglicerolés presentes en la mezcla de reacción para cada reuso de la enzima. Se llevó a cabo este proceso las veces necesarias para observar variación del contenido de ésteres en la mezcla. Con base en los resultados obtenidos hasta este punto se evaluó el efecto de algunos parámetros que pueden afectar la estabilidad de la enzima al ser reutilizada.

- ❖ **Efecto de la temperatura.** Con el objetivo de disminuir el consumo energético y mejorar la estabilidad de la enzima, se llevó a cabo la alcoholólisis a una temperatura menor y se evaluó el efecto en el rendimiento de los ETE's a través de los reusos. El procedimiento

fue igual al empleado en la evaluación de la estabilidad pero usando una temperatura de 40°C.

❖ **Efecto de la adición de agua.** Se estudió el efecto de adición de agua al medio de reacción en el reuso. Se realizaron 3 series de reacciones y en cada una de ellas se uso Lipozyme IM por 3 veces consecutivas. En cada serie se adicionó agua destilada en porcentajes de 1%, 5% y 10% con respecto al peso total de la enzima, respectivamente. Los productos obtenidos fueron analizados para determinar el efecto del agua en la producción de ETE's.

❖ **Efecto de la adición de *silica gel*.** Para evaluar el efecto de la adición de gel de sílice se llevaron cabo 2 series de reacciones, pero adicionando al medio *silica gel* en porcentajes de 10% y 20% con respecto al peso del aceite, cantidades que se adicionaban nuevamente luego de cada uso de la enzima. Los productos obtenidos se analizaron para determinar el efecto de la *silica gel* la producción de ETE's.

▪ **Empleo de Lipozyme TL.** Se decidió usar de manera exploratoria otro catalizador, una nueva preparación lipasa alternativa soportada en *silica gel*: Lipozyme TL (lipasa de *Thermomyces lanuginosa*). Se llevaron a cabo 2 series de reacciones empleando Lipozyme TL en igual cantidad y bajo las mismas condiciones que para Lipozyme IM pero con adición de *silica gel* al 10% y 20% en cada reuso de la lipasa. Se evaluó la estabilidad de la enzima analizando los productos obtenidos luego de cada uso sucesivo.

## 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos indicados a continuación se emplearon para la caracterización del PKO y de los productos obtenidos en la reacción de alcoholisis.

**2.3.1 Índice de acidez.** Se define como los miligramos de KOH necesarios para saturar los ácidos grasos libres contenidos por gramo de aceite. Por tratarse de aceite láurico se expresó también como porcentaje de ácido láurico. Para su determinación se utilizó el método AOAC 940.20/1990 [5].

Se pesaron 0,5 g de muestra, luego se agregaron 5 mL de etanol absoluto y 2 gotas de fenolftaleína. Esta mezcla se calentó hasta 50°C e inmediatamente se tituló con una solución acuosa de KOH 0,05 N. Las determinaciones se realizaron por duplicado. El índice de acidez se calculó con base en la ecuación 1. El porcentaje expresado como ácido láurico se obtuvo empleando la ecuación 2.

Ecuación 1. Índice de acidez

$$Ia = \frac{V \times N \times 56}{pm}$$

Ecuación 2. Porcentaje de ácido láurico

$$\%AL = \frac{mlKOH \times N \times 20}{pm}$$

*Ia: índice de acidez, AL: ácido láurico, V: volumen mL solución valorante, N: normalidad de la solución valorante, pm: peso de la muestra en gramos*

**2.3.2 Índice de saponificación.** Se define como los miligramos de KOH requeridos para saponificar por gramo de aceite. Para su determinación se utilizó el método AOAC 920.160/1990 [5].

Se prepararon soluciones de KOH etanólico 1,00 N y HCL acuoso 0,5 N. En un balón de fondo plano se pesaron 2 g de aceite de palmiste y se adicionaron 25 mL exactos de la solución de KOH. Esta mezcla se sometió a reflujo durante una hora y posteriormente se valoró en caliente con la solución de HCl 0,5 N. La determinación se hizo por duplicado y usando un blanco de control. Se calculó con base en la ecuación 3.

Ecuación 3. Índice de saponificación

$$IS = \frac{(B - M) \times n \times 56}{pm}$$

*IS: índice de saponificación, B: mL HCl gastados en el blanco, M: mL de HCl gastados en la muestra, pm: peso de la muestra en gramos*

**2.3.3 Solubilidad del alcohol en PKO.** La solubilidad se definió como los gramos de alcohol solubles en 100 g de aceite en el punto de saturación a una temperatura constante. Este parámetro también se expresó como porcentaje. Para la determinación se empleó

metanol, etanol, 2-propanol y butanol a temperaturas entre 40°C y 70°C de acuerdo a un método descrito por Ma [53].

En tubo de ensayo con tapa se pesaron aproximadamente 3 g de PKO el cual se incubó en baño termostático a 40°C por diez minutos. Se adicionaron 0.3 mL del alcohol seleccionado seguido de agitación manual vigorosa. Se incubó nuevamente por diez minutos. La adición del alcohol se repitió hasta llegar al punto de saturación en el cual se observó enturbiamiento de la solución y separación fases. El procedimiento se repitió para temperaturas de 50, 60 y 70°C.

**2.3.4 Actividad hidrolítica.** La actividad de una enzima en determinada reacción se define como la cantidad de la misma que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de producto en 1 minuto. Se llevó a cabo la determinación con base en el método descrito por Moreno [60] y Nouredini [63]. La actividad hidrolítica se determinó usando como sustrato PKO en emulsión a una temperatura de 55°C para efectuar una comparación adecuada con los resultados obtenidos de las reacciones de alcoholisis. La emulsión se preparó mezclando aceite de palmiste (500 mg), 9,5 mL de solución de cloruro de sodio (0,89% NaCl p/v) y 500 mg de goma arábica, agitando fuertemente durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para efectuar la determinación se mezclaron 20 mL de la emulsión preparada y solución de cloruro de sodio al 0.89% hasta completar un volumen de 40 mL. El pH fue ajustado a 8 por adición de NaOH 10 mM. La mezcla se incubó a 55°C con agitación constante en presencia de 40 mg de Lipozyme IM. Los ácidos grasos liberados se titularon por adición continua de NaOH 10mM empleando una bureta automática en modo *pH Stat* (pH = 8).

**2.3.5 Análisis de ácidos grasos en el sustrato PKO.** La composición en ácidos grasos del PKO fue determinada empleando HRGC. La muestra de aceite se sometió a metilación con KOH metanólico. Se prepararon 10 mL de solución metanólica de KOH 2M. Se pesó 1 g de PKO en un tubo de ensayo con tapa y se agregaron 10 mL de hexano con agitación. Luego a la mezcla se adicionó 1mL de la solución de KOH metanólica y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Se centrifugó y de la capa superior se tomaron 100  $\mu$ l, los cuales se aforaron a 1mL con hexano. De esta solución se inyectó 1  $\mu$ l directamente al cromatógrafo de gases.

La determinación cuantitativa de los ácidos grasos se realizó de acuerdo con la norma NTC 5013 utilizando un equipo cromatográfico Agilent HP 6890 Plus con detector FID. Se empleó una columna DB-WAX (30m x 0.32mm x 0.25µm) con la siguiente programación de temperatura: 100°C (0 min.) -170°C a 20°C/min., 170°C (2 min.) - 250°C (20 min.) a 10°C/min. Las demás condiciones de trabajo fueron: gas de arrastre Helio a 1mL/min., inyector a 250°C modo split en relación 80:1, FID a 270°C.

Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de FAMES analizado bajo las mismas condiciones: *Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1 AMP. La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas, en el cual se suman las áreas de todos los componentes y se indica el porcentaje de área que pertenece a los componentes de interés.

**2.3.6 Análisis de ésteres grasos y acilglicerolos en productos.** La ésteres grasos, mono, di y triacilglicerolos en los productos de alcoholisis se determinaron simultáneamente empleando HTGC. En las etapas de selección del alcohol y optimización de las condiciones se emplearon métodos cromatográficos y equipos diferentes (Agilent HP 6890 Plus y Perkin Elmer Autosystem XL) por razones de economía.

▪ **Preparación de patrones.** Como patrones para la calibración se empleó una mezcla de ETE's preparados y purificados a partir del PKO. Para cuantificar los TAG's en los productos se utilizó el PKO como patrón, pesando el aceite y diluyendo con hexano a diferentes concentraciones conocidas. Se prepararon soluciones de cinco concentraciones diferentes tanto de ETE's como de TAG's.

Los ETE's empleados como patrones se elaboraron por un método análogo a la metilación con KOH. Para ello, se prepararon 10 mL de solución etanólica de KOH 2M. Se pesó 1 g de aceite en un tubo de ensayo con tapa y se agregaron 10 mL de hexano con agitación. Luego a la mezcla se agregó 1mL de la solución de KOH etanólico y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Se centrifugó por 30 min. y la capa superior fue extraída y separada evaporando por calentamiento el solvente, obteniendo así la mezcla de ETE's los cuales se pesaron y disolvieron con hexano en diferentes concentraciones para preparar las curvas de calibración.

Las cantidades de cada serie de patrones y sus concentraciones se indican en las Tablas 5 y 6. Las ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración para cada serie de patrones, fueron empleadas para calcular el contenido total de TAG's y ETE's en los productos obtenidos de todos los experimentos.

Tabla 5. Concentración de los patrones de ETE's

Patrón	[ ] Total (mg/mL)	[ ] IS (mg/mL)	[ ] Total / [ ] IS	Área total/Área IS
EE1	1,247	0,536	2,327	1,352
EE2	3,132	0,536	5,844	3,348
EE3	5,307	0,536	9,901	5,700
EE4	7,366	0,536	13,743	8,017
EE5	9,454	0,536	17,639	11,948

IS: estándar interno, [ ]: concentración

Tabla 6. Concentración de los patrones de TAG's

Patrón	[ ] Total (mg/mL)	[ ] IS (mg/mL)	[ ] Total / [ ] IS	Area total/Area IS
A1	1,9	0,536	3,545	2,514
A2	5,2	0,536	9,702	7,716
A3	11,3	0,536	21,083	17,091
A4	15,6	0,536	29,106	21,237
A5	24,6	0,536	45,897	31,069

IS: estándar interno, [ ]: concentración

▪ **Productos obtenidos en la etapa de selección del alcohol.** De cada mezcla de reacción (de la A hasta la H) se tomaron 25µl y se aforaron a 1mL en viales utilizando hexano como solvente. De esta dilución se tomaron 0.2 µl para inyectar directamente en el equipo.

La determinación de de ésteres grasos, mono, di y triacilgliceroles en la mezcla de reacción se realizó de acuerdo con una adaptación del método citado por Moreno [60]. Se empleó un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL con una columna HP-1 (5m x 0.53mm x

0.15 $\mu$ m) y la siguiente programación de temperatura: 40°C (1 min.)- 240°C a 20°C/min., 240°C - 320°C (3 min.) a 10°C/min. Las demás condiciones fueron: gas de arrastre Argón (0.8 psi), inyector a 315°C modo split, FID a 320°C.

▪ **Productos obtenidos en las etapas de optimización.** De cada mezcla de reacción obtenida se pesaron 10 mg en viales, agregando 60 $\mu$ l de estándar interno (colesterol en hexano, 9mg/mL) aforando con hexano hasta 1mL. De esta dilución se tomó 1  $\mu$ l para inyectar directamente en el equipo.

La determinación de ésteres grasos, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles se realizó de acuerdo con una adaptación de los métodos citados por Aichholz [2], Nelson [62], Plank [73] y Selmi [79]. Se utilizó un equipo cromatográfico Agilent HP 6890 Series Plus dotado con una columna capilar DB-17 ht (30m x 0.32mm x 0.15 $\mu$ m) con la siguiente programación de temperatura: de 100°C - 250°C a 40°C/min., 250°C - 360°C (6 min.) a 7°C/min. Las demás condiciones fueron: gas de arrastre Helio a 2mL/min., inyector a 360°C modo split (relación 60:1), FID a 370°C.

▪ **Identificación y cuantificación.** La identificación se hizo empleando los tiempos de retención relativos de los componentes con respecto a un estándar interno (colesterol en hexano, 9mg/mL) y empleando los datos de los perfiles cromatográficos obtenidos en el análisis del PKO comparando el orden de elusión y asignando cada pico a un ácido graso respectivo (numeral 2.3.5). La cuantificación se realizó por el método del estándar interno empleando las curvas de calibración obtenidas tanto para los ETE's como para los TAG's. El colesterol se designó como estándar interno ya que es una sustancia lipídica, no se solapa con los picos de los componentes en los productos y presenta un tiempo de retención intermedio entre los ésteres etílicos y los acilgliceroles presentes.

Los ésteres etílicos y triacilgliceroles se determinaron simultáneamente como grupos y bajo condiciones idénticas de análisis. Mono y diacilgliceroles (PAG's) se cuantificaron como grupo por diferencia. La determinación por grupos se refiere a que el área expresada es el área total de todos los ácidos grasos encontrados en el aceite y en los TAG's es el área total de todos los triacilgliceroles presentes en el PKO o en los productos.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS

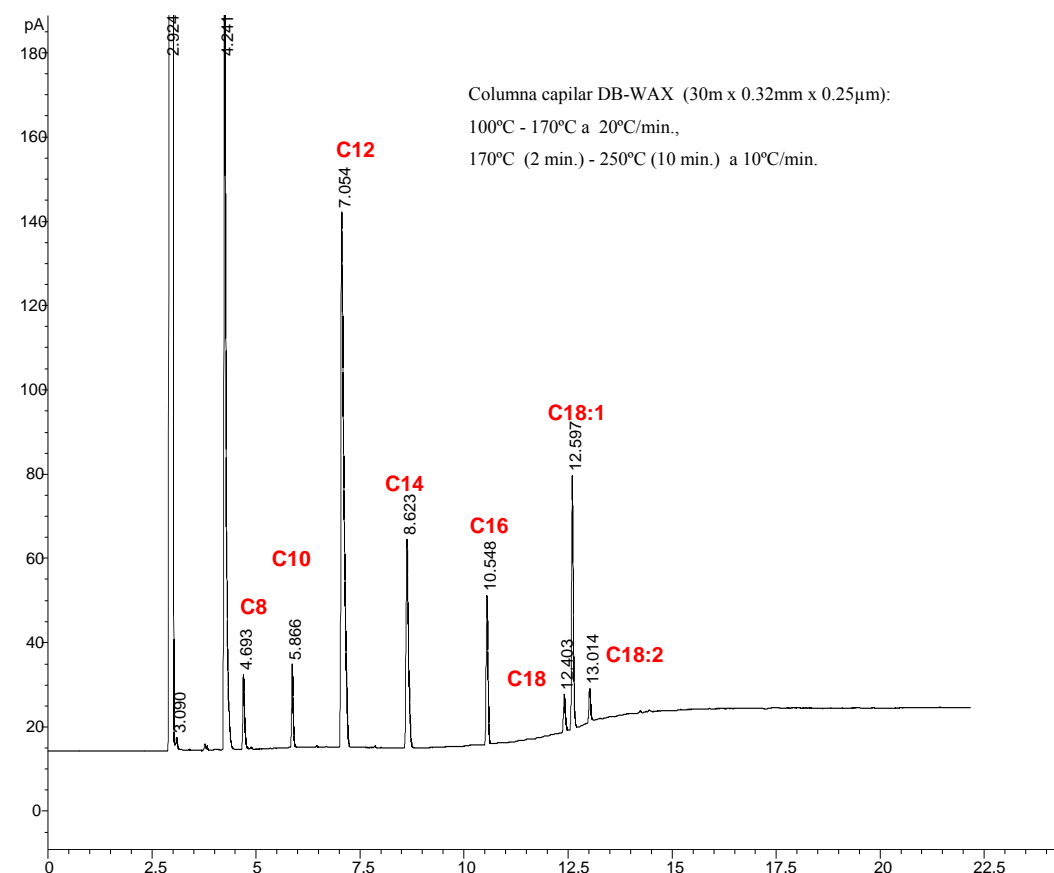
El aceite de palmiste fue analizado en cuanto a su composición individual de ácidos grasos y TAG's. También se determinaron otros parámetros físicoquímicos necesarios para establecer su pureza e identidad. Con estos valores dentro de las normas especificadas (NTC 5013 y NTC 260) se verificó la calidad del aceite, requisito indispensable para llevar a cabo un análisis correcto de los parámetros involucrados en la reacción de alcoholisis.

**3.1.1 Composición en ácidos grasos del PKO.** Los ácidos grasos constituyentes del PKO fueron determinados por HRGC siguiendo las indicaciones y métodos recomendados por la norma técnica colombiana NTC 5013. La composición porcentual en ácidos grasos y el perfil cromatográfico se presentan en la Tabla 7 y en la Figura 13 respectivamente.

Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos en el PKO.

Ácido graso	Porcentaje
Caprílico - C8:0	4,0
Cáprico - C10:0	3,8
Laúrico - C12:0	50,6
Mirístico - C14:0	16,1
Palmítico - C16:0	8,4
Esteárico - C18:0	2,1
Oléico - C18:1	13,1
Linoléico - C18:2	1,9

Figura 13. Perfil cromatográfico de ésteres de ácidos grasos en el PKO



Los valores indicados en la Tabla 7 se encuentran dentro los intervalos estipulados por la norma NTC 260 para el PKO RDB. El mayor porcentaje lo representan los ácidos láurico, mirístico y oléico, por tanto se espera obtener en mayor proporción ésteres de estos ácidos grasos.

De acuerdo con esta composición se calculó un valor de 697,09 g/mol para el peso molecular promedio de un triacilglicerol en el PKO, suponiendo que los ácidos grasos se presentan al azar en la molécula y teniendo en cuenta su abundancia. Este peso molecular se utilizó como base para los cálculos de las relaciones molares entre sustratos aplicados según el diseño experimental.

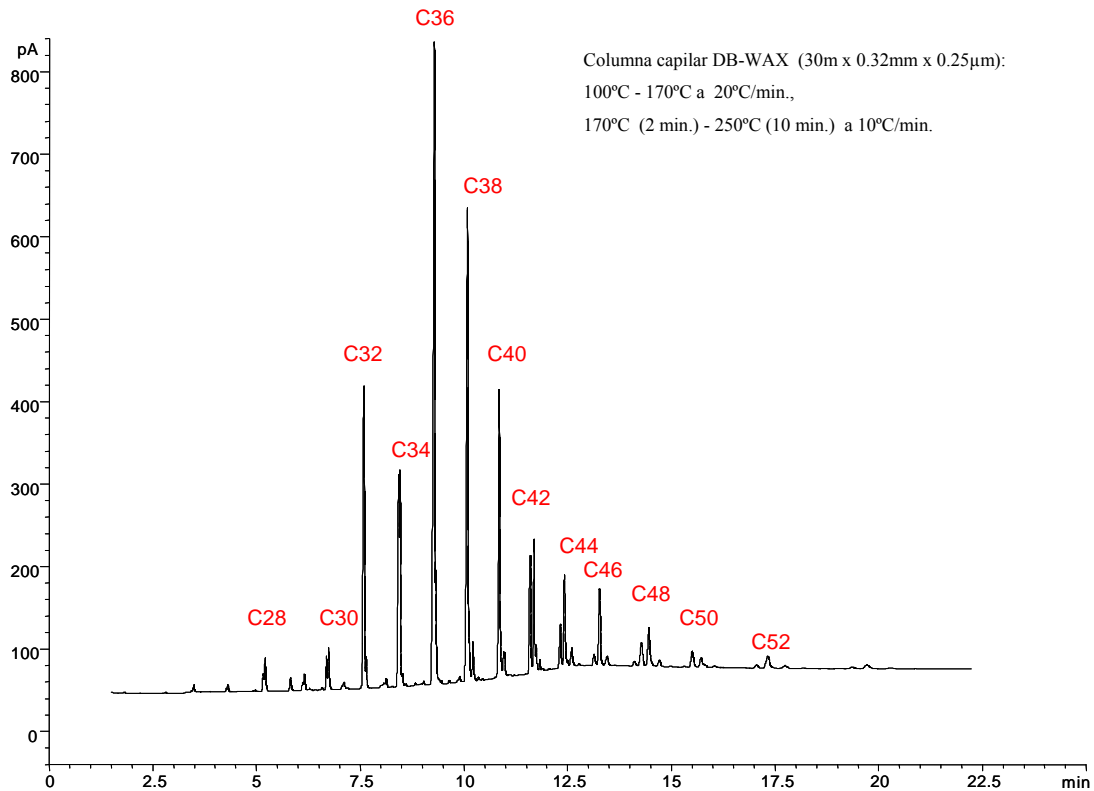
**3.1.2 Composición en TAG's del aceite de palmiste.** Se determinó por HTGC la composición en TAG's como especies moleculares presentes en el aceite. En la Tabla 8, se presenta la composición porcentual de cada TAG agrupado por número de carbonos (ACN). En la Figura 14, se muestra el perfil cromatográfico.

Tabla 8. Composición porcentual de TAG's en el PKO.

<b>Triacilglicerol ACN</b>	<b>Porcentaje</b>
C28	2,8
C30	4,0
C32	7,5
C34	9,3
C36	22,4
C38	16,8
C40	9,7
C42	8,1
C44	5,7
C46	4,4
C48	4,3
C50	2,1
C52	1,6

El aceite de palmiste presentó 13 grupos de TAG's de acuerdo con su ACN, siendo el de mayor proporción la trilaurina (C36) debido a su alto contenido de ácido láurico. El perfil concuerda con los datos reportados por Young [102] para el PKO, siendo uno de los pocos aceites vegetales cuya composición es una mezcla compleja de diferentes triacilgliceroles en comparación con aceites como los de soya o de palma.

Figura 14. Perfil cromatográfico de TAG's en el PKO



**3.1.3 Índice de acidez y de saponificación.** El índice de acidez hace parte de los indicadores de calidad del aceite y del grado de hidrólisis en el mismo. Fue necesaria su determinación como parámetro de estudio ya que un exceso de acidez en los sustratos puede inactivar irreversiblemente la lipasa.

El valor obtenido fue de 0,16 como índice de acidez y de 0,06% expresado como porcentaje de ácido láurico, el cual que se encuentra dentro de los parámetros aceptables para un aceite refinado según la norma NTC 260. A este nivel los ácidos grasos libres no interfieren significativamente en el proceso de alcoholisis.

El índice de saponificación hallado para el PKO fue de 251, el cual se encuentra acorde con la norma técnica NTC 260 que estipula un rango tolerable de 240-255.

**3.1.4 Caracterización de productos.** En todos los productos obtenidos, los ésteres y acilgliceroles presentes se determinaron simultáneamente empleando HTGC. La caracterización se realizó de acuerdo con el numeral 2.3.6, determinando la composición de ésteres grasos, mono, di y triacilgliceroles así como del porcentaje de FFA's en cada muestra.

Se desarrolló un método cromatográfico que permitió la elución de todos los componentes de interés y su clasificación en 3 grupos: ésteres etílicos (ETE's), acilgliceroles parciales PAG's (MAG's + DAG's) y triacilgliceroles (TAG's). Debido a que los componentes se clasificaron en grupos no fue necesaria la identificación individual de cada pico en el cromatograma.

En las Figuras 15 y 16 se observa el perfil cromatográfico de los patrones de TAG's y ETE's respectivamente, eluidos bajo condiciones idénticas. En la Figura 17 se muestra el perfil cromatográfico de un producto obtenido con ETE's en alta concentración, donde se indican sus zonas características. En cada una de las secciones posteriores se describe con detalle la composición de los productos y se discute el resultado obtenido de acuerdo a la etapa de optimización.

Figura 15. Perfil cromatográfico de TAG's en el patrón de PKO

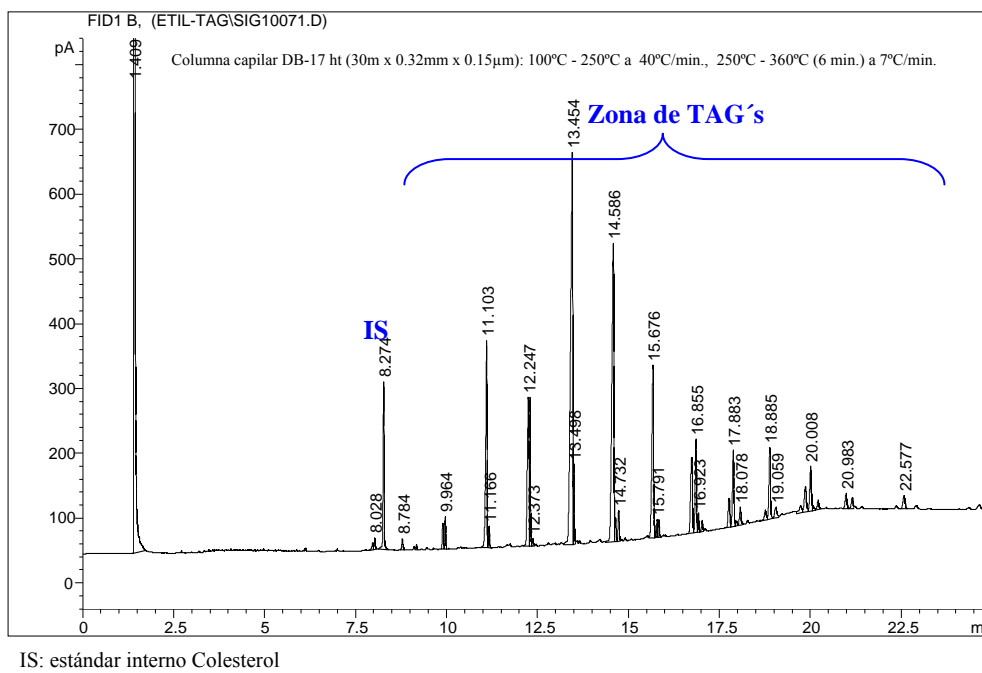
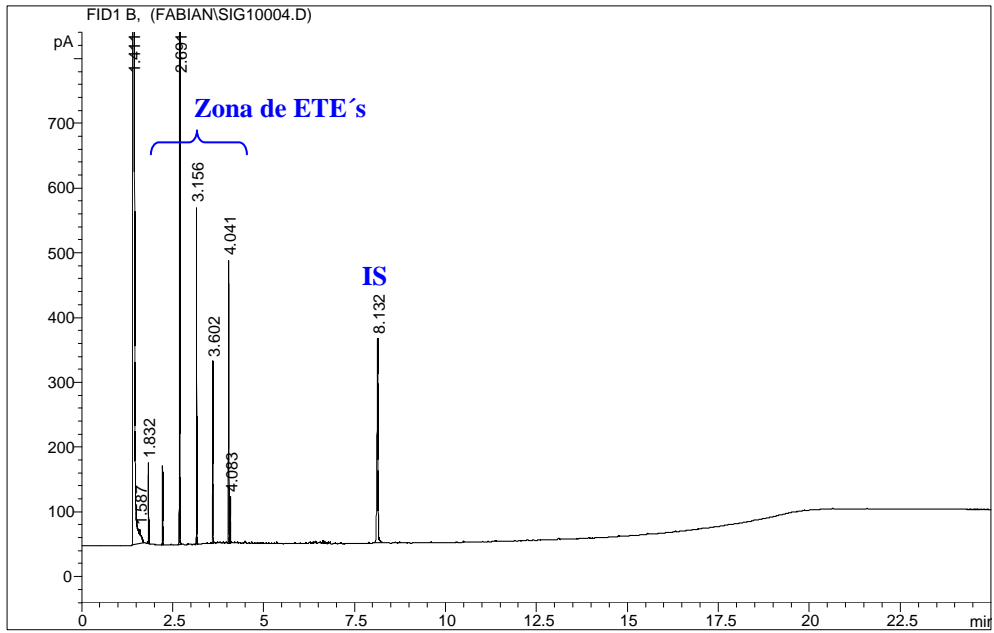
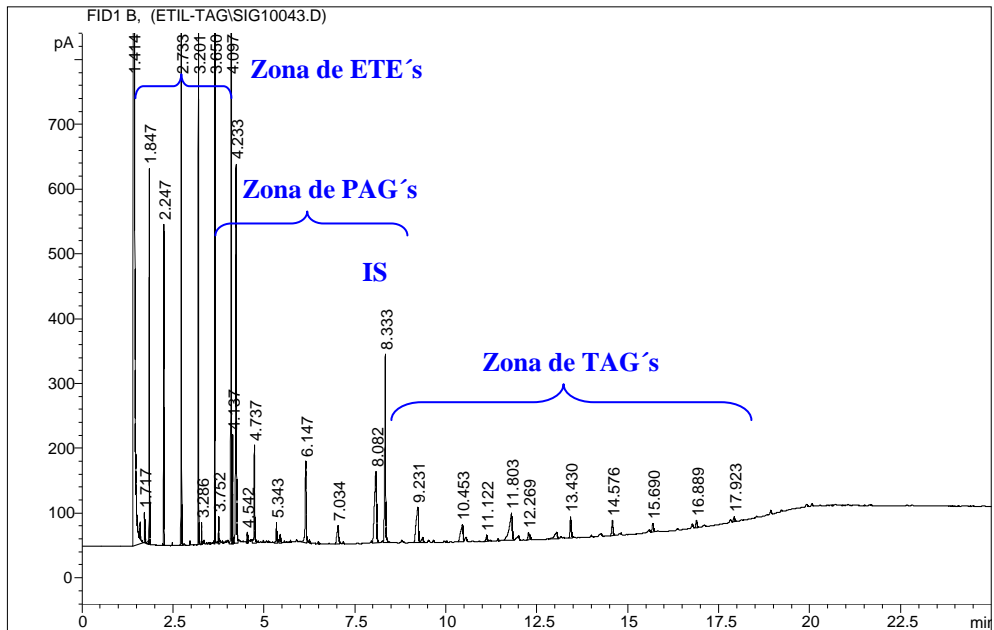


Figura 16. Perfil cromatográfico del patrón de ETE's



IS: estándar interno Colesterol

Figura 17. Perfil cromatográfico de un producto obtenido por alcoholisis (ETE's del 67%)



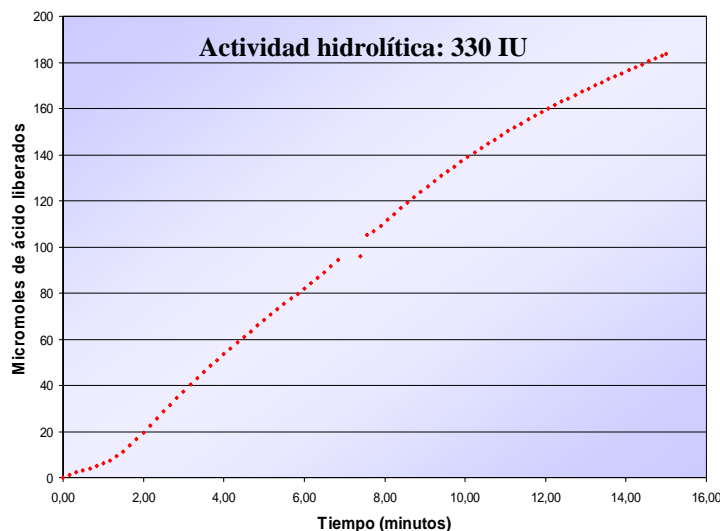
IS: estándar interno Colesterol

Según la Figura 17, la zona de ETE's corresponde a los ésteres etílicos de los 8 ácidos grasos principales que conforman el PKO, con tiempos de retención desde 1,847 hasta 4,137 aproximadamente. La zona de PAG's corresponde a los mono y diacilgliceroles formados en la reacción los cuales presentan tiempos de retención desde 4,233 hasta 9,231, es decir que los PAG's generalmente eluyen antes del IS o en su vecindad. Los TAG's son fácilmente identificables ya que eluyen luego del IS con tiempos de retención desde 9,231 hasta 17,923. Los tiempos de retención mencionados son indicadores que permitieron delimitar las zonas en las cuales se agruparon los componentes.

### 3.2 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA

**3.2.1 Determinación de la actividad hidrolítica de Lipozyme IM.** En la Figura 18, se muestra la curva de valoración con la cual se calculó la actividad hidrolítica de la enzima obteniendo un valor de 330 IU, donde  $1 \text{ IU} = \text{micromoles de ácido liberado} / \text{minuto} * \text{gramo de enzima}$ . El cálculo de la actividad se realizó empleando una regresión polinómica, con un coeficiente de correlación de 0,9912 adecuado para obtener la pendiente de la tangente a la curva en el tiempo cero, cuyo valor representa la actividad buscada. La actividad hidrolítica de las lipasas está directamente correlacionada con su actividad en síntesis pero es independiente de su actividad en las reacciones de transesterificación, sin embargo es recomendable que la lipasa presente una alta actividad hidrolítica ya que en el mecanismo de reacción de alcoholisis se presentan pasos de hidrólisis y síntesis sucesiva [39, 101].

Figura 18. Determinación de la actividad hidrolítica de Lipozyme IM



**3.2.2 Evaluación del alcohol como sustrato.** Se analizaron varios factores que permitieron definir el alcohol a emplear como sustrato en la reacción y llevar a cabo el procedimiento de optimización de las condiciones.

- **Solubilidad del alcohol en PKO.** La solubilidad es un factor determinante en las reacciones de alcoholólisis y se expresó como los gramos de alcohol solubles en 100 g de aceite en el punto de saturación. Una baja solubilidad de los reactivos impide su contacto íntimo, disminuyendo el rendimiento de la reacción. Además, reactivos polares (ej. metanol) que no se solubilizan totalmente pueden inactivar irreversiblemente la enzima al entrar en contacto con ella.

Un valor numérico de la solubilidad es el primer indicador del alcohol que podría proporcionar altos rendimientos, siendo mejor el más soluble en el aceite, aún cuando esta no sea una razón exclusiva. En las Figuras 19 y 20 se muestran las curvas de solubilidad para el metanol y etanol, ya que tanto 2-propanol como butanol mostraron ser miscibles con el PKO en todas las proporciones a una temperatura mayor de 40°C.

Para calcular los datos de la solubilidad de metanol y etanol se emplearon regresiones exponenciales las cuales se ajustaron adecuadamente a los datos obtenidos. Empleando estas ecuaciones fue posible predecir la solubilidad de cada alcohol en el aceite a una temperatura determinada. Se observa como para el etanol la solubilidad se incrementa muy rápidamente al aumentar la temperatura, lo cual favorece su uso en la reacción.

En cada caso se calcularon los valores de solubilidad a 55°C comparando metanol vs. etanol (Figura 21). A esta temperatura Lipozyme IM presenta el desempeño más favorable para las reacciones de esterificación según su productor y la bibliografía consultada. La temperatura óptima de trabajo para esta enzima en reacciones de alcoholólisis se encuentra en el intervalo de 40°C - 60°C [35, 57,62, 82, 100].

Figura 19. Curva de solubilidad de metanol en PKO

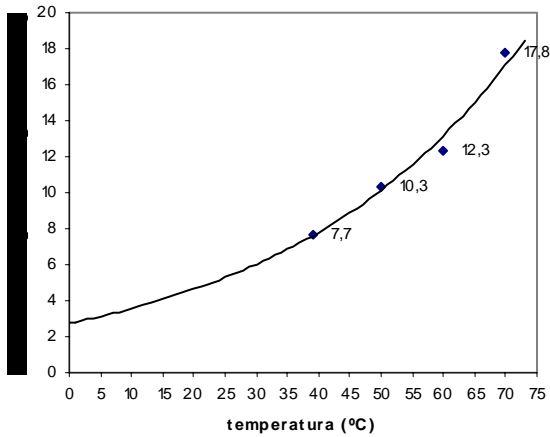


Figura 20. Curva de solubilidad de etanol en PKO

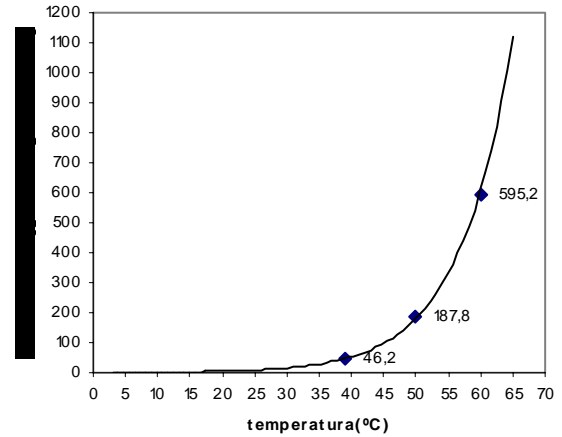
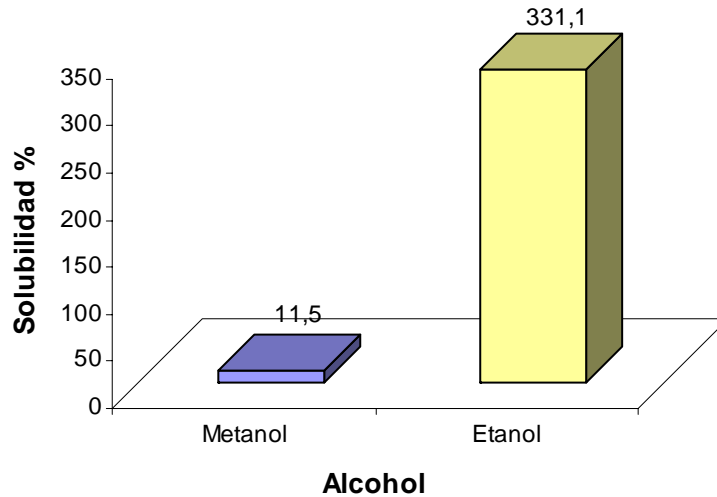


Figura 21. Comparación de solubilidad de metanol y etanol en PKO a 55°C



La solubilidad del etanol a 55°C fue aproximadamente 30 veces superior a la del metanol, efecto favorable pues el contacto entre los sustratos es mejor y al mismo tiempo actúa como solvente. Debido a que son miscibles y se presenta una sola fase es menor la probabilidad de que se formen gotas aisladas que puedan interactuar directamente con la lipasa causando inactivación. Además a esta temperatura, la viscosidad es favorable para la homogenización de la enzima y se generan menos problemas de difusión que involucren la agitación como un

parámetro de estudio adicional. El metanol es parcialmente soluble en el aceite a temperaturas cercanas a 70°C, debido a su limitada solubilidad, al llegar al punto de saturación se presenta una rápida separación de fases. Este efecto hace imprescindible el uso de solvente al efectuar reacciones con metanol.

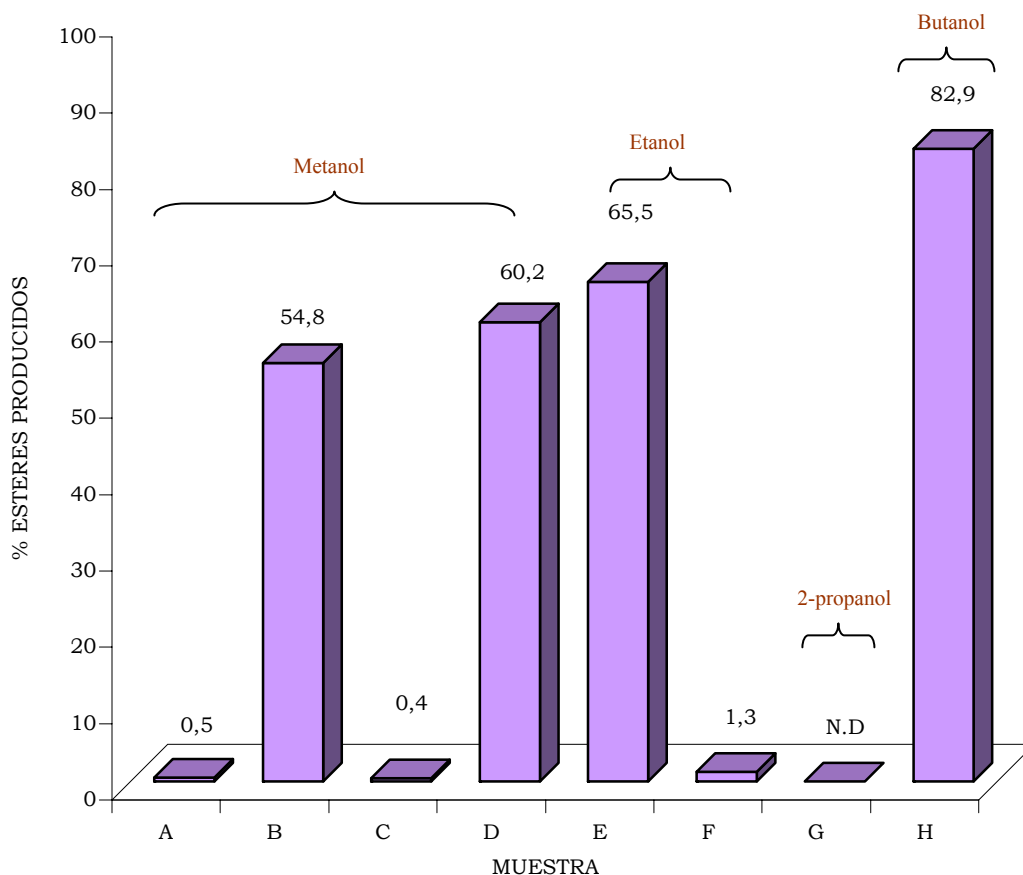
▪ **Selección del alcohol.** Como segundo indicador para seleccionar el alcohol, se llevó a cabo la reacción manteniendo condiciones similares para todos. Fue posible estudiar el efecto de cada alcohol empleado y el uso de hexano como solvente. En la Tabla 9, se muestran las condiciones de trabajo en cada experimento y en la Figura 22 se relacionan los resultados obtenidos.

Tabla 9. Condiciones experimentales del diseño de prueba para alcoholes

MUESTRA	ALCOHOL <sup>a</sup>	RELACIÓN MOLAR ALCOHOL/ACEITE	SOLVENTE
A	Metanol	3	No
B	Metanol	1,5	No
C	Metanol	3	Hexano <sup>c</sup>
D	Metanol	1,5	Hexano <sup>c</sup>
E	Etanol	3	No
F	Etanol <sup>b</sup>	3	No
G	2-propanol	3	No
H	Butanol	3	No

a: alcoholes absolutos excepto muestra H, b: Etanol comercial al 96%, c: 200% peso de aceite. Todas las reacciones a 55°C

Figura 22. Variación en la producción de ésteres en función del alcohol



La mayor producción de ésteres se logró en los experimentos E (65,5%) y H (82,9%), en los cuales se usó etanol y butanol respectivamente, en relación molar 1:3 (aceite: alcohol), a la cual se denomina relación estequiométrica (*reqm*) por simplicidad. Ambos alcoholes a *reqm* mostraron un elevado rendimiento, teniendo en cuenta que también se formaron mono y diacilgliceroles en porcentajes del 15%. A *reqm* butanol y etanol son completamente solubles con el PKO y la reacción transcurre en una sola fase con baja viscosidad. Esto fue previsto según las pruebas de solubilidad realizadas con anterioridad: el etanol y butanol gracias su mayor longitud de cadena y menor polaridad son más compatibles con el PKO.

Cuando se empleó metanol en *reqm* (A) no se obtuvo un resultado similar. Se deduce que debido a su naturaleza polar se presenta inhibición de la enzima. Además, las condiciones de solubilidad y viscosidad no son tan favorables como para los otros alcoholes, ya que se observó una fase turbia con gotas remanentes. Empleando metanol a *reqm* sólo se obtuvo un

0,5% de ésteres. Usando la mitad de la *reqm* bajo idénticas condiciones se elevó el rendimiento hasta un 54,8 %, indicando que el metanol no solubilizado es un fuerte inhibidor y que su adición fraccionada permite que la reacción transcurra sin inactivación de la enzima.

En las reacciones con metanol y adición de hexano como solvente los resultados fueron casi idénticos a aquellos sin empleo de solvente (A y B) probando que el empleo de un sustrato polar y un solvente no polar, no necesariamente mejora el rendimiento del proceso. Es probable que reacciones con metanol exijan su adición fraccionada en cantidades pequeñas para evitar la inactivación de la enzima o el empleo de algún otro tipo de solvente no polar. Tal es el caso de Shimada [82] y Watanabe [98], quienes utilizando lipasa inmovilizada de *Candida antarctica*, observaron que la adición del metanol en tres etapas fue efectiva para la completa conversión del aceite.

Se aprecia también, como la solubilidad no es el único factor decisivo para conseguir un alto rendimiento. En el caso G, al emplear 2-propanol no se detectaron cantidades apreciables de ésteres aun cuando éste alcohol y el aceite fueron miscibles a la temperatura de trabajo. Lipozyme IM solo se comportó eficientemente en reacciones con alcoholes lineales pero no con un alcohol ramificado. Similares resultados se han reportado, al emplear 2-butanol y 2-propanol [30, 40], por lo que podría suponerse que con alcoholes secundarios y terciarios puede ocurrir un impedimento estérico que dificulta el acoplamiento de la lipasa con los sustratos.

También se empleó etanol comercial al 96% (F) para establecer la influencia debida al agua presente como impureza. En este caso el rendimiento decayó drásticamente (1,3 %) en comparación con el etanol absoluto (65,3 %), donde se aprecia que el agua del sustrato alcohólico ejerce un efecto de inhibición fuerte, aún cuando se ha encontrado que varias reacciones de transesterificación con Lipozyme IM pueden ocurrir eficientemente en presencia de agua [62].

En un trabajo anterior, Mittelbach [57] al utilizar etanol del 96% consiguió rendimientos del 82%, empleando lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-30) en un tiempo de 14 horas y a 50°C. Wu [100] empleando también lipasa PS-30 y etanol al 95% obtuvo ésteres con rendimiento mayor al 75%, en un tiempo de 6 horas y a 38°C. Se debe tener en cuenta que estos

rendimientos se lograron empleando lipasa de *Pseudomonas sp.* en forma soluble - no inmovilizada, así, puede suponerse que el tipo de lipasa empleada y el soporte de inmovilización influyen considerablemente cuando se emplean reactivos con presencia de agua. Bajo las condiciones del presente trabajo, empleando Lipozyme IM es requisito indispensable el carácter anhidro de los reactivos y un bajo nivel de agua para el transcurso de la reacción con alta eficiencia.

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares se escogió al etanol anhidro para efectuar la optimización de las variables de reacción. La elección del etanol se justifica teniendo en cuenta que fue aproximadamente 30 veces más soluble que el metanol a la temperatura de trabajo (55°C) y presentó un buen desempeño en el *screening* realizado con producción de ésteres etílicos en un 65,5%. Adicionalmente es ventajoso su empleo porque es menos tóxico que el metanol y más seguro en su manejo, más económico que el butanol u otros alcoholes de mayor peso molecular, se puede obtener totalmente a partir de biomasa y presenta un punto de ebullición de 78°C lo cual permite extender la temperatura de reacción si fuese necesario.

Los ésteres del etanol además de su creciente aplicación como biodiesel [38, 94, 95] se consideran agentes aromatizantes naturales [16, 31] y se emplean como materia prima para la fabricación de surfactantes potentes, seguros y biodegradables, muy semejantes a aquellos obtenidos a partir de ésteres metílicos [32, 44, 48, 74].

**3.2.3 Determinación de las condiciones óptimas.** Una vez seleccionado el etanol como sustrato, en la etapa de optimización de condiciones, se empleó un diseño experimental tipo *CCRD*, encontrando sus puntos óptimos con la metodología RSM.

▪ **Análisis de las variables.** En la Tabla 10, se indican las respuestas experimentales obtenidas para cada experimento. En el desarrollo del análisis se hallaron las combinaciones de variables en las cuales el contenido de FFA's fue mínimo y la producción de ETE's máxima, teniendo en cuenta que a nivel industrial la remoción de ácidos grasos libres implica una etapa adicional y es un proceso costoso (Mantilla, 2002)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Comunicación personal del Ingeniero Christian Mantilla, Gerente Técnico C.I. SACEITES S.A, 2003

Según los datos obtenidos, teniendo en cuenta solo los efectos principales, un mayor tiempo de reacción y mayor cantidad de enzima generan un aumento en la cantidad de ETE's formados. Al parecer, un exceso de alcohol no conlleva a un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de ésteres, por el contrario, se aprecia un efecto de inactivación sobre la enzima y se hace más intenso cuanto mayor es la concentración de etanol.

Tabla 10. Resultados obtenidos en los experimentos del diseño CCRD

<b>Experimento</b>	<b>% Enzima (X<sub>1</sub>)</b>	<b>Relación molar etanol/PKO (X<sub>2</sub>)</b>	<b>Tiempo de reacción (horas) (X<sub>3</sub>)</b>	<b>Y<sub>1</sub><sup>§</sup> % ésteres</b>	<b>Y<sub>2</sub><sup>§</sup> % acidez</b>
1	6	3	3	69,7	1,5
2	6	7	9	9,5	0,3
3	4	5	6	11,5	0,2
4	4	5	6	10,7	0,2
5	4	5	11*	14,7	0,2
6	2	3	3	20,8	0,4
7	4	1,6*	6	52,9	4,7
8	4	5	6	11,0	0,2
9	2	7	3	1,7	0,1
10	6	7	3	4,8	0,2
11	0,6*	5	6	1,9	0,1
12	6	3	9	73,9	1,2
13	2	3	9	40,2	0,4
14	7,3*	5	6	18,3	0,3
15	2	7	9	1,9	0,1
16	4	5	0,95*	4,6	0,2
17	4	8.3*	6	2,8	0,1

\* Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad,

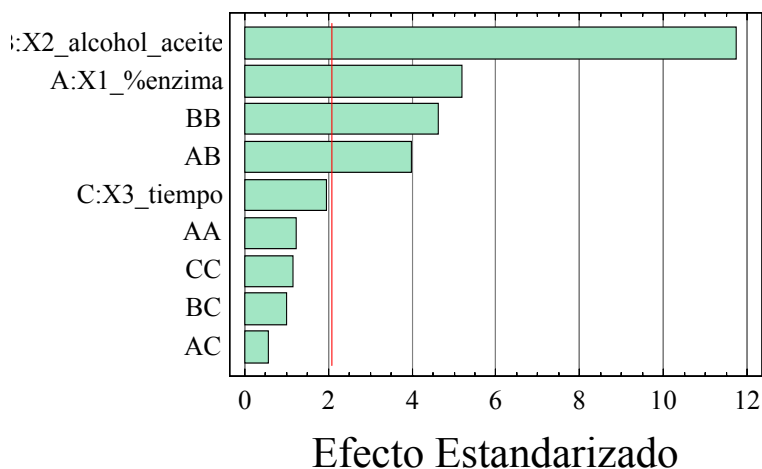
§ promedio de dos determinaciones

Se observa también una correlación directa entre el porcentaje de acidez y el exceso de etanol agregado en cada reacción, igual relación se presenta con la concentración de enzima. A mayor concentración de etanol, la hidrólisis y el índice de acidez disminuyen. Este comportamiento puede deberse a la inactivación de la enzima por parte del alcohol o a un efecto de competencia del agua presente en el medio [31, 101].

Considerando los datos como un conjunto y empleando el análisis estadístico de las variables fue posible con este tipo de diseño definir una combinación óptima de variables de manera que se obtuviera un porcentaje alto de ésteres etílicos y se consiga alta productividad.

- **Efectos sobre la formación de ésteres (Respuesta  $Y_1$ ).** Una fácil visualización de los efectos se consigue en el diagrama de Pareto (Figura 23), donde se muestra cada efecto estimado de las variables elegidas en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar). Las barras que se extienden más allá de la línea roja corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95 %.

Figura 23. Diagrama de Pareto para  $Y_1$  (% ETE's)

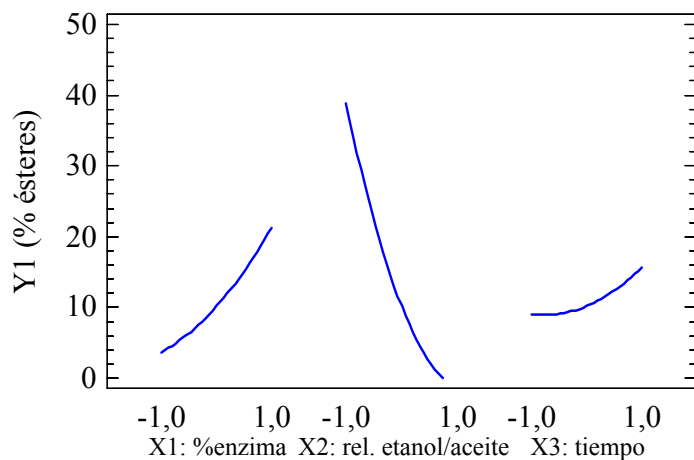


La concentración de etanol presenta un fuerte efecto negativo en la reacción, por tanto un aumento en la concentración de etanol conduce a una disminución considerable en la formación de ésteres. Este efecto se justifica debido a la naturaleza polar del etanol, que ejerce un fuerte efecto inhibitorio en la enzima alterando su microambiente ya sea por la

extracción del agua esencial para mantener su forma activa o por un cambio en su conformación al crear interacciones con grupos polares en la estructura de la proteína según lo señalado por Gandhi [30, 31], Zaks, [104]; Gorman [37].

En la Figura 24, los efectos principales muestran la influencia negativa o positiva de cada variable en la producción de ésteres, así la pendiente en cada línea indica la intensidad y rapidez del efecto. La variable estimada se presenta como función de cada factor experimental, donde el factor de interés varía desde su nivel más bajo al más alto, mientras que los otros factores permanecen constantes en sus valores centrales.

Figura 24. Gráfico de efectos principales para  $Y_1$



➤ La cantidad mínima de etanol que es posible usar sin disminuir el rendimiento, es una *reqm* (relación molar 3/1), relaciones menores implican una reacción incompleta, donde el aceite empleado no se consume en su totalidad generando mayor contenido de triacilgliceroles remanentes en el medio.

Es posible que el etanol se absorba en el soporte de la lipasa (resina de intercambio aniónica) alterando el ambiente de la lipasa. Es recomendable, en este caso, emplear la menor cantidad de etanol para proteger la enzima a diferencia del empleo de catalizadores básicos inorgánicos, donde generalmente el reactivo se adiciona en exceso para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto.

- La cantidad de enzima adicionada es el segundo factor más significativo entre los estudiados. Este comportamiento se explica considerando que una mayor cantidad de enzima representa más disponibilidad de sitios activos para interactuar con los sustratos. Sin embargo, no es posible emplear cantidades excesivas de enzima ya que está limitada por su costo y por los problemas de agitación y homogenización de la mezcla de reacción. Es aconsejable emplear la cantidad máxima posible dentro del intervalo estudiado en el diseño.
- El tiempo es un factor poco significativo en la reacción ( $p > 0,05$ ). Los estudios realizados reportan tiempos de reacción desde 6 hasta 72 horas [57, 62, 93, 90, 45].
- Los efectos cruzados de las interacciones entre variables son significativos solo para la cantidad de enzima y relación de sustratos, indicando que el comportamiento con respecto a la respuesta no es lineal sino que presenta un orden cuadrático, tal y como se aprecia en las superficies de respuesta.

El análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta  $Y_1$  (Tabla 11), permite analizar estadísticamente las variables. En este caso sólo 4 efectos tienen valores  $p$  (nivel de significancia) menores que 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero en un nivel de confianza del 95,0%. El valor de  $R^2$  estadístico es de 89,95 % señalando que el modelo como se ajustó, explica el 89,95 % de la variabilidad en la respuesta  $Y_1$ .

Se realizó una regresión múltiple polinómica obteniendo una ecuación que describe matemáticamente el proceso con la mayor precisión posible. En la tabla 12, se indican los coeficientes de regresión que satisfacen esta ecuación (EC. 4) donde todos los coeficientes fueron considerados, incluidos aquellos de interacciones poco significantes ( $p > 0,05$ ).

Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) para Y<sub>1</sub> (% ésteres)

Variable	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	Relación F	Valor P
A: X1 (%enzima)	2131,5	2131,5	26,62	0,0000
B: X2 (rel. etanol/aceite)	10999,6	10999,6	137,35	0,0000
C: X3 (tiempo)	296,6	296,6	3,70	0,0668
AA	117,3	117,3	1,46	0,2385
AB	1256,7	1256,7	15,69	0,0006
AC	23,5	80,1	0,29	0,9592
BB	1842,0	1698,7	0,00	0,0001
BC	75,7	75,7	0,95	0,3411
CC	104,0	104,0	1,30	0,2661
Bloques*	0,214	0,214	21,21	0,5931
Total	18329,8			

\* El análisis considera dos bloques: los 17 experimentos originales y sus 17 réplicas, p: nivel de significancia

Tabla 12 Coeficientes de regresión para Y<sub>1</sub> (% ésteres)

Variable	Coefficiente
constante	10,189
A: X1 (%enzima)	8,834
B: X2 (rel. etanol/aceite)	-20,067
C: X3 (tiempo)	3,295
AA	2,148
AB	-8,862
AC	-1,212
BB	8,679
BC	-2,175
CC	2,280

Según estos datos la ecuación que describe el modelo ajustado es:

$$Y_1 = 10,19 + 8,83 \cdot X_1 - 20,07 \cdot X_2 + 3,29 \cdot X_3 + 2,28 \cdot X_1^2 - 8,86 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1,21 \cdot X_1 \cdot X_3 + 8,68 \cdot X_2^2 - 2,18 \cdot X_2 \cdot X_3 + 2,15 \cdot X_3^2 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde,

$Y_1$ : porcentaje de ésteres en el producto

$X_1$ : %enzima

$X_2$ : relación molar alcohol/aceite

$X_3$ : tiempo de reacción

Con base en la ecuación 4 se realizó la optimización empleando un procedimiento matemático en el cual se maximizan o minimizan las respuestas y se obtienen los valores de las variables que satisfacen la respuesta máxima  $Y_1$ . Este ejercicio matemático no se realiza directamente, para su ejecución se acudió a un programa de análisis estadístico (*Statgraphics*).

Empleando la ecuación polinómica se representaron gráficamente las variables obteniendo superficies donde se deduce el efecto de cada variable, el camino más rápido al punto máximo y se realizan predicciones del comportamiento de las variables dentro del intervalo estudiado. Las superficies de respuesta más relevantes se observan en las Figuras 25 y 26 y muestran contornos para las variables en función del factor seleccionado. Cada línea de contorno representa combinaciones de los factores que dan un valor para la variable, los otros factores son mantenidos constantes.

Figura 25. Superficie de respuesta  $X_2$  vs.  $X_1$  ( $X_3$  constante)

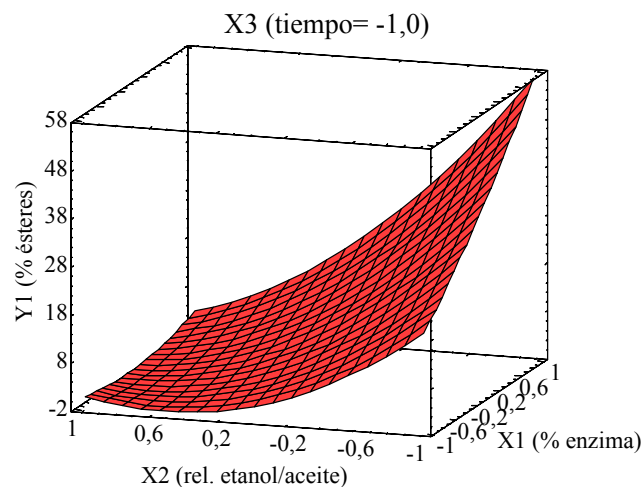
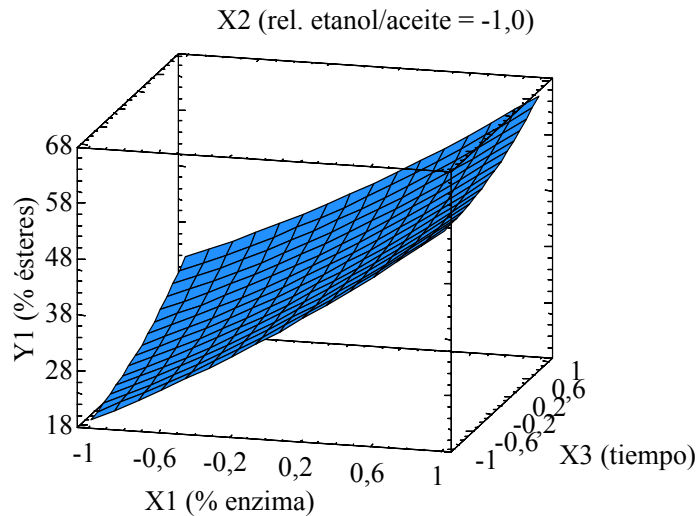


Figura 26. Superficie de respuesta  $X_1$  vs.  $X_3$  ( $X_2$  constante)



- **Efectos sobre el índice de acidez (Respuesta  $Y_2$ ).** La acidez es importante porque indica la ocurrencia de hidrólisis como reacción competitiva a la alcoholólisis. Cuando esto sucede se liberan ácidos grasos que permanecen en el producto final, siendo necesario retirarlos por neutralización básica lo cual genera gastos adicionales en el proceso y puede dejar residuos contaminantes en el producto.

El contenido de FFA's más alto encontrado fue de 4,7 %, utilizando la mitad de *reqm*, por tanto en el transcurso de la reacción el aceite remanente debió permanecer disponible para realizar la hidrólisis. Hidrólisis y alcoholólisis son reacciones competitivas y se espera que bajas cantidades de alcohol favorezcan la hidrólisis. El promedio de acidez encontrado fue del 0,6%, sin embargo algunas muestras exhiben una acidez menor que 0,2%.

En el diagrama de Pareto para la respuesta  $Y_2$  (Figura 28) la influencia de las variables se analiza de manera análoga a la respuesta  $Y_1$ . También se incluye la gráfica de efectos principales (Figura 27) indicando la tendencia negativa o positiva de las variables hacia la respuesta  $Y_2$ .

Figura 27. Diagrama de efectos principales para  $Y_2$  (% FFA's)

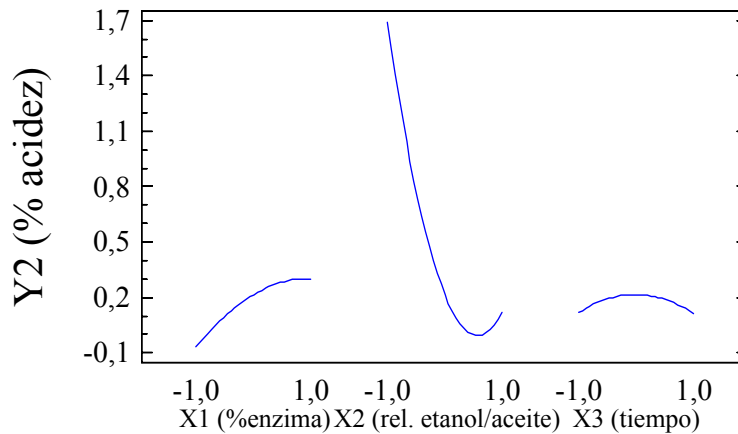
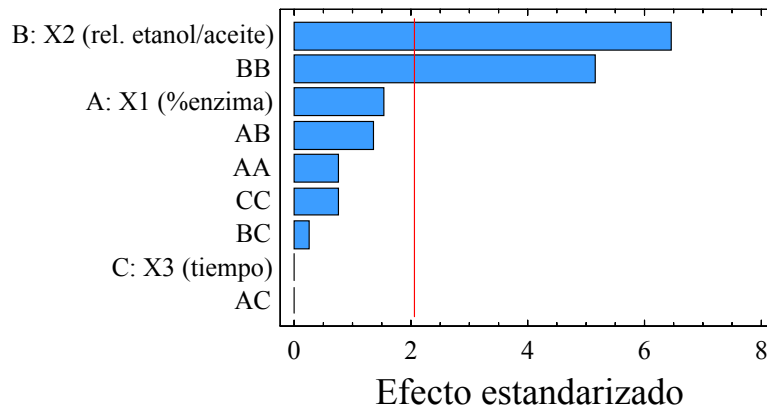


Figura 28. Diagrama de pareto para  $Y_2$  (% FFA's)



➤ La única variable significativa para efectos prácticos es la concentración del alcohol, igual de influyente que para la respuesta  $Y_1$ , sin embargo con relación inversa ya que la acidez disminuye a medida que la concentración de etanol se incrementa.

Posiblemente el exceso de alcohol hace que actué como nucleófilo competitivo, favorece su equilibrio y su ataque tiene mayor importancia con respecto al agua. Por el contrario, cuando se tiene baja concentración de etanol, el agua no tiene competencia equivalente y aún cuando se encuentra en baja concentración la hidrólisis es la reacción predominante [30].

➤ El tiempo no es significativo, como tampoco la cantidad de enzima debido a que la lipasa como catalizador favorece ambas reacciones, alcoholólisis e hidrólisis. Cual se lleve a cabo a mayor velocidad, depende de la concentración relativa del nucleófilo presente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar el efecto sobre las respuestas  $Y_1$  y  $Y_2$  y empleando el modelo matemático (Ecuación 4) se calcularon las condiciones más favorables (COI) para la obtención de un proceso eficiente con un rendimiento aceptable en ésteres etílicos (Tabla 13).

Tabla 13. Condiciones óptimas iniciales (COI) para la reacción de alcoholólisis a escala laboratorio

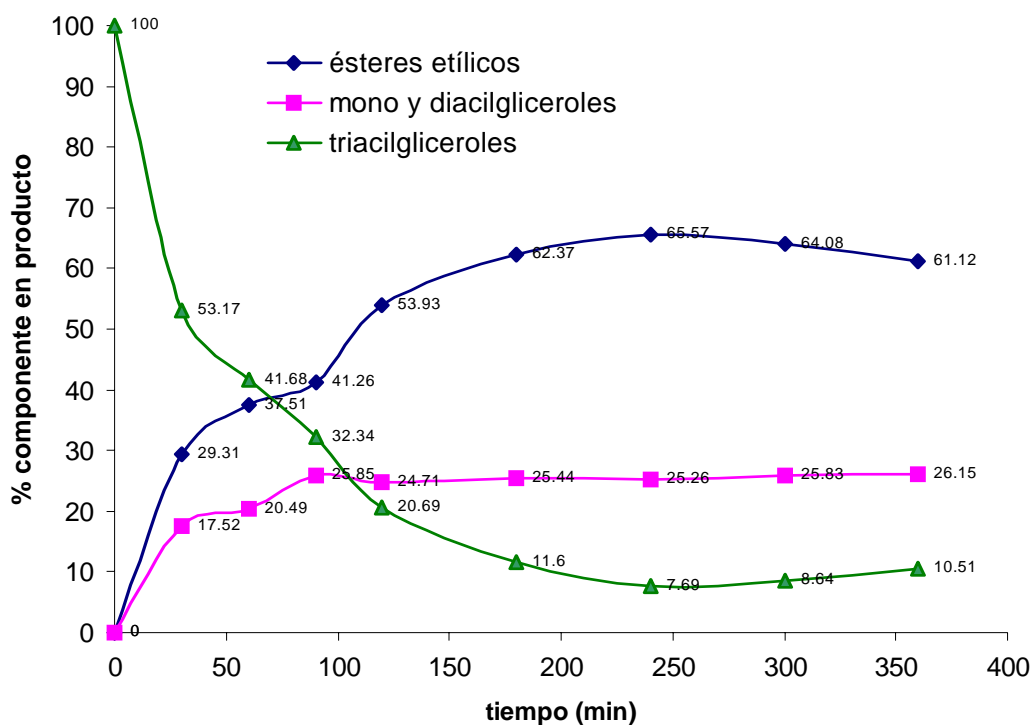
<b>Temperatura</b>	55°C
<b>Relación molar de sustratos (etanol/aceite)</b>	3/1
<b>Tiempo de reacción (horas)</b>	6
<b>Cantidad de enzima (% con respecto al peso del aceite)</b>	6%
<b>Agitación orbital (rpm)</b>	300
<b>Valor predicho (% ésteres etílicos)</b>	59
<b>Valor observado (% ésteres etílicos)</b>	65

Empleando las variables óptimas calculadas, el valor predicho para la producción de ésteres es del 59% sin embargo el valor observado es de 65%. Esta discrepancia del 6% puede deberse a la exclusión en el diseño experimental de otras variables que pueden afectar la producción de ésteres etílicos como la presencia de agua en el medio y las diferencias en el sistema de agitación. Para el caso del agua como se describe más adelante, ésta presenta una influencia significativa aún en valores adicionados del 1%. Una vez definidas las COI a escala laboratorio se procedió a evaluarlas en una reacción a escala preparativa y se realizó un seguimiento cinético de la formación de los productos con el fin de comprender mejor el

funcionamiento de la enzima al emplear un mayor volumen de sustratos y a la vez conseguir una mejora en el tiempo.

▪ **Evaluación del punto óptimo a escala preparativa.** Se evaluó la formación de ésteres, mono, di y acilgliceroles y la desaparición de triacilgliceroles en el tiempo, realizando el proceso a escala preparativa. Se emplearon las COI designadas anteriormente con base en el diseño experimental analizado, excepto el tipo de agitación. En este caso se empleó una propela marina de tres aspas para realizar la agitación a una velocidad de 200 rpm, debido a la imposibilidad de usar otro tipo de agitación con cantidades superiores a los 100g. Por espacio de 6 horas se tomaron muestras del producto y se realizó un análisis de su composición para estudiar la evolución en el tiempo (Figura 29).

Figura 29. Seguimiento de la reacción en el tiempo a escala preparativa



Se observa que a partir de 3 horas el incremento de ésteres etílicos es poco significativo. Después de dos horas el porcentaje de PAG's permanece constante hasta el final de la reacción. La concentración de triacilgliceroles decrece rápidamente durante las primeras horas. De los triglicéridos iniciales el 53,9% es convertido a ésteres etílicos a las dos horas.

La concentración de mono y diacilgliceroles incrementan a un máximo de 25,9% en 2 horas, permaneciendo constante durante las 4 horas siguientes.

Se observa una velocidad inicial rápida en la producción de ésteres etílicos hasta las tres horas, luego de las cuales decae y se hace estable, lo que indica una posible disminución de la actividad de la enzima, ya sea por deficiencia de los sustratos, inhibición por solvente o por inactivación a causa de los productos formados. Los ésteres etílicos alcanzan su máximo valor de 65,6% en 4 horas pero a las 5 horas decrecen a pesar de que el residuo de triacilgliceroles solo llega a ser del 8,8%.

Con base en el seguimiento realizado, las condiciones óptimas finales (COF) obtenidas en el presente estudio fueron las presentadas en la Tabla 14, en la cual se comparan con valores obtenidos en otras investigaciones similares.

Tabla 14. Condiciones óptimas finales (COF) comparadas con estudios anteriores

<b>Variable</b>	<b>COF estudio</b>	<b>Selmi<sup>a</sup></b>	<b>Abigor<sup>b</sup></b>
Temperatura (°C)	55	50	40
Relación molar de sustratos (etanol/aceite)	3/1	3/1	4/1
Tiempo de reacción (horas)	3	5	8
Cantidad de enzima (% con respecto al peso del aceite)	6	8	10
Agitación (rpm)	200 (propela mecánica)	250 (orbital)	250 (orbital)
Esteres etílicos obtenidos (%)	62	83	72
Mono y diacilgliceroles obtenidos (%)	25	--	--
Triacilgliceroles obtenidos (%)	10	--	--

<sup>a</sup> Reacción llevada a cabo con aceite de girasol y Lipozyme IM, sin adición de agua ni solvente

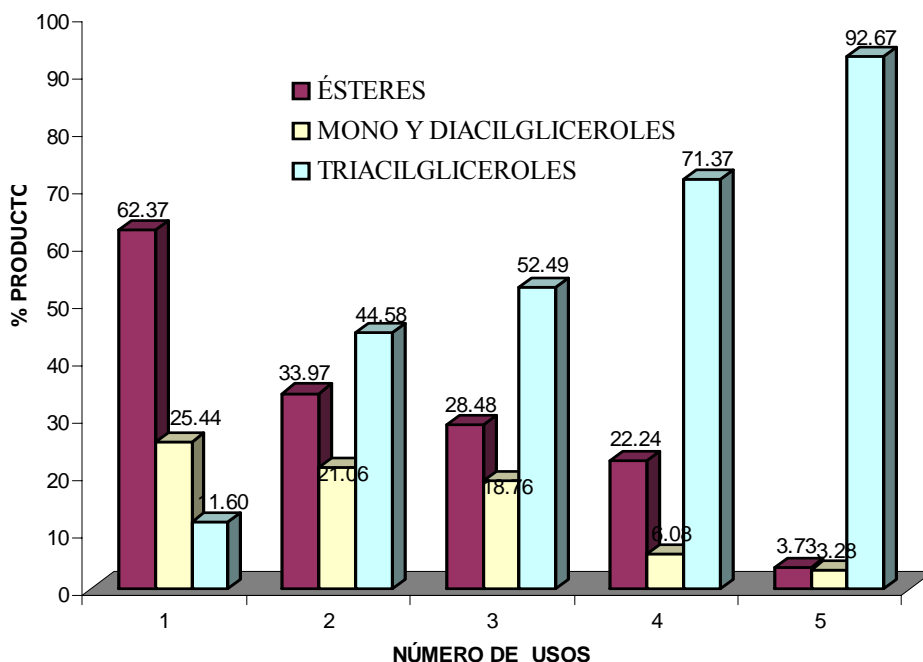
<sup>b</sup> Reacción llevada a cabo con aceite de palmiste y Lipasa PS 30, sin adición de agua ni solvente

En el presente estudio el tiempo de reacción y la cantidad de enzima encontrada fueron menores, disminuyendo los costos del proceso. La relación 3/1 con etanol permite obtener buen rendimiento y una mínima producción de residuos. Sin embargo el rendimiento de ésteres etílicos a estas condiciones no fue mayor del 62,4 % debido en parte a la alta producción de PAG's (25%) que se producen sin forma de evitarlo, se debe tener en cuenta que el residuo de TAG's bajo estas condiciones en el producto final fue solo del 10%, lográndose una conversión final del 90% de los TAG's en el aceite de palmiste.

▪ **Estabilidad operacional de la enzima a escala preparativa**

Para evaluar la estabilidad de Lipozyme IM se realizaron varias reacciones consecutivas de alcoholísis en sistemas *Batch* bajo condiciones COF, en cada caso se determinó el porcentaje de productos en el medio de reacción luego de cada reuso y los resultados se muestran la Figura 30.

Figura 30. Estabilidad operacional de Lipozyme IM a 55°C

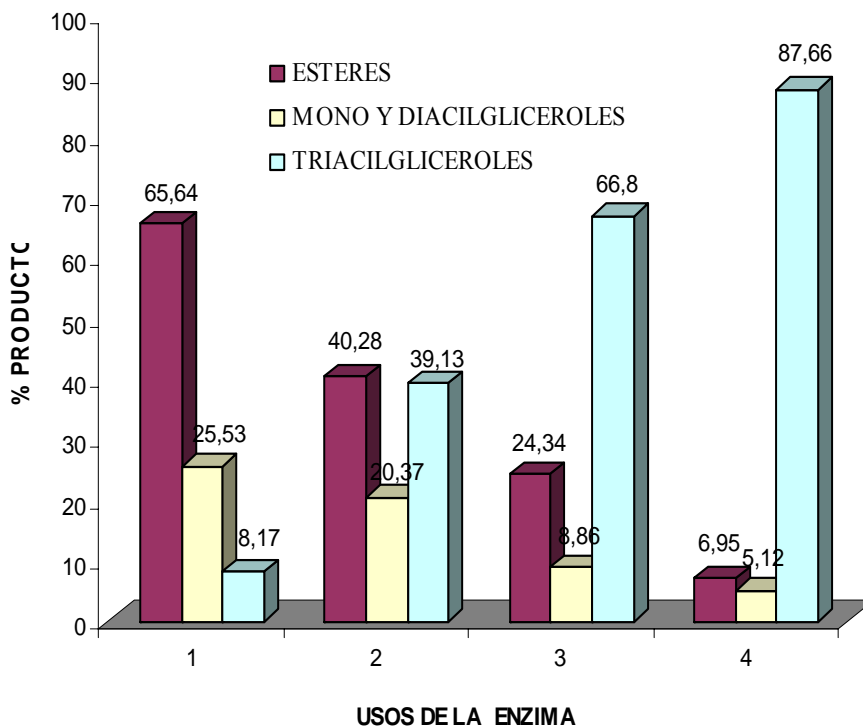


El contenido de ETE's disminuyó rápidamente con el número de usos, hasta un valor de 3,73% en el quinto uso. El contenido de PAG's también disminuyó paulatinamente hasta un valor de 3,28% es decir que en el quinto uso la conversión fue baja, debido probablemente a

la pérdida de actividad de la enzima la cual puede ser causada por el glicerol que se absorbe en el soporte o por la pérdida de agua debido a su extracción por parte del etanol. En búsqueda del aumento de la estabilidad operacional se decidió llevar a cabo reacciones a menor temperatura, en presencia de agua y en presencia de *silica gel* en el medio como agente absorbente de glicerol.

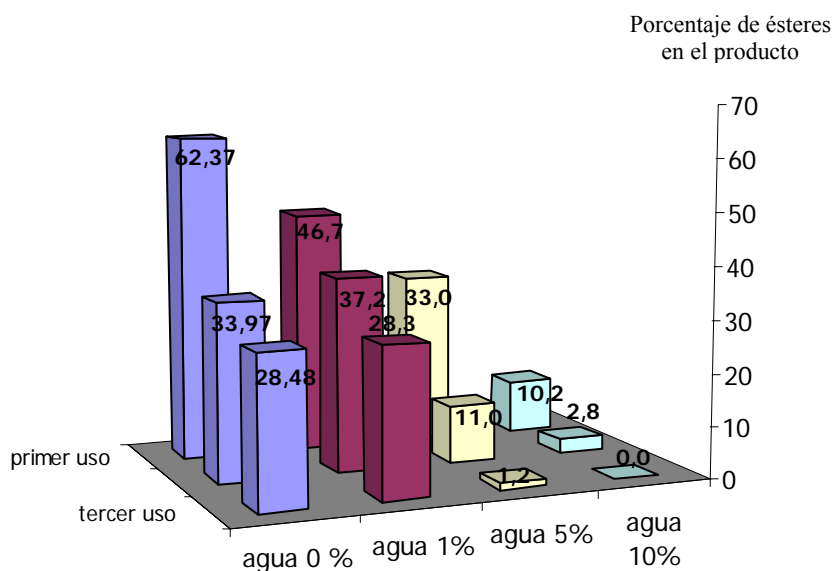
➤ Se realizó la medición de la estabilidad, bajo las condiciones COF pero una temperatura de reacción de 40°C. La disminución de la temperatura no afectó considerablemente el rendimiento de los ETE's en el primer uso, pero tampoco mejoró la estabilidad de la enzima luego de 4 usos sucesivos (Figura 31). Por tanto, el factor inactivante no está relacionado directamente con la temperatura sino con la naturaleza de los reactivos o productos que actúan luego del primer uso. Es posible efectuar la reacción a 40°C sin disminución del rendimiento de los ETE's en el primer uso, reduciendo el consumo energético en comparación con el uso de una temperatura de 55°C. Sin embargo en los análisis siguientes se mantuvo la temperatura óptima encontrada de 55°C (condiciones COF)

Figura 31. Estabilidad operacional de Lipozyme IM a 40°C



❖ **Efecto del agua.** A pesar que anteriormente ya se había definido que la mayor producción de ésteres se lleva a cabo en condiciones anhidras, se decidió agregar agua al medio luego de cada reuso debido a la posible extracción del agua por parte del etanol. La extracción de agua esencial para la óptima configuración de la enzima puede ser la causa de su inactivación luego de cada uso. Para verificar esta influencia se realizaron 9 experimentos con adición de agua al sistema, cuyos resultados se comparan en la Figura 32.

Figura 32. Estabilidad de Lipozyme IM con adición de agua (condiciones COF)



La adición de agua en tan sólo 1% conlleva a una disminución en la producción de ésteres desde 62,3% hasta 46,7% en el primer uso de la enzima y decae hasta un valor de 28,3% en el tercer uso. Aparentemente a este nivel sólo se afecta la producción de ésteres en el primer uso pero no en los siguientes. Con adición del 5%, la disminución es mas notable, hasta el 33,0% en solo el primer uso y para el tercer uso sólo se consigue un 1,25% de ésteres. El agua en cantidad de 10% no permite que la reacción sea favorable para la producción de ésteres en ningún caso, quizás por el alto grado de hidrólisis que se genera, o por el cambio brusco en la  $A_w$  óptima para Lipozyme.

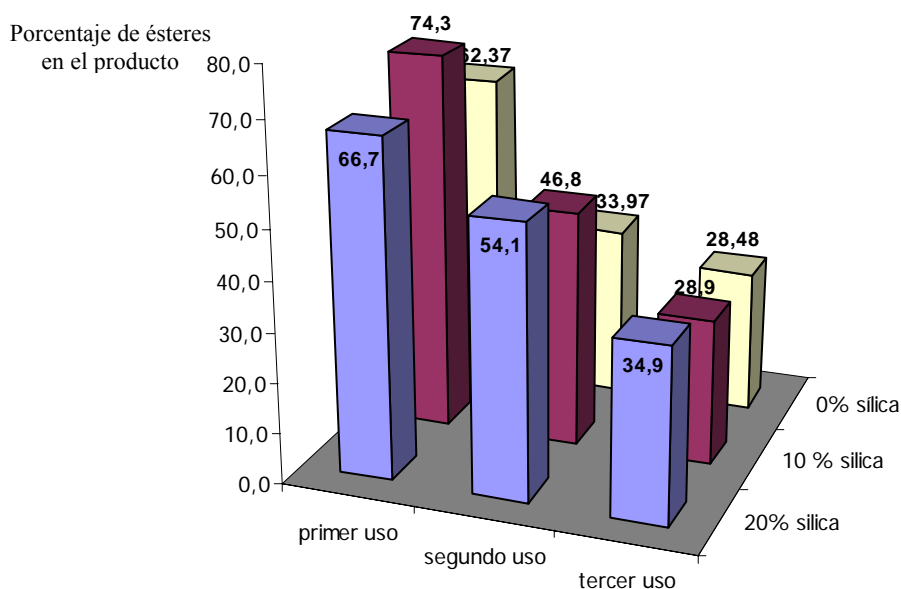
Según los resultados obtenidos se concluye que la adición de agua no restaura en ningún caso la actividad enzimática de Lipozyme IM luego de su reuso, por tanto el efecto de inactivación

debe ser causado por el glicerol que se produce en la reacción y su absorción (o adsorción) en el soporte.

➤ **Efecto de la *silica gel*.** Para confirmar el posible efecto del glicerol sobre la enzima se adicionó al medio un agente protector que compite con el soporte por el glicerol y probablemente evita la pérdida de la actividad de la enzima durante los reusos. [40, 79, 85]. Una cantidad de *silica gel* fue adicionada al medio de reacción junto con la enzima y se realizó una comparación entre la producción de ésteres etílicos bajo las condiciones finales (COF), en presencia y ausencia de *silica gel* (Figura 33).

En el primer uso de la enzima la producción de ésteres etílicos fue mayor (74,1%) con adición de sílica gel al 10%, y semejante que al adicionar sílica al 20% (66,7%), con respecto a las reacción sin empleo de absorbente (62,4%). En los dos usos siguientes, la adición de sílica gel mejoró la producción de ésteres en todos los casos, sin embargo el contenido de ésteres al usar *silica gel* al 20%, es menor que empleando un 10%, posiblemente a este nivel la sílica también absorbe parte de los ésteres formados y disminuye su contenido aparente en el medio.

Figura 33. Estabilidad de Lipozyme IM con adición de *silica gel* (condiciones COF)



Según las observaciones es probable que en todos los casos la inactivación se lleve a cabo luego del primer uso de la enzima debido al glicerol formado, el cual presenta más afinidad por la resina de intercambio empleada como soporte en Lipozyme, razón por la cual la *silica gel* solo presenta un efecto limitado protector sin importar la cantidad adicionada.

Dossat et al., en la transesterificación de aceite de girasol con butanol empleando Lipozyme IM, encontraron que el glicerol insoluble en el producto era adsorbido en el soporte enzimático generando una disminución dramática en la actividad de la enzima. Este fenómeno de inactivación fue atribuido a la formación de un impedimento hidrofílico alrededor de la enzima que genera problemas de difusión del sustrato hidrofóbico. Para recuperar la actividad varias soluciones fueron propuestas: la adición de sílica gel para adsorber el glicerol y el lavado de la enzima con acetona-hexano, sin embargo estos procedimientos no restauraron la actividad. Finalmente se empleó una mezcla de un alcohol terciario y agua para lavar el catalizador, así el glicerol fue eliminado del soporte y la enzima recuperó su actividad acuosa óptima [17].

Debido a que no se logró mantener la estabilidad de Lipozyme IM en los reusos para la producción de ésteres etílicos a escala preparativa, es escasa la posibilidad de su uso en aplicaciones a nivel industrial. Tal hecho hace necesaria la utilización de una enzima que mantenga su estabilidad y que sea similar en su desempeño a Lipozyme IM bajo iguales condiciones de trabajo. Recientemente se ha presentado en el mercado la introducción de Lipozyme TL una preparación lipasa más económica que Lipozyme IM, derivada de *Thermomyces lanuginosa* pero soportada en *Silica gel*, la cual debido a sus diferencias podría ser más eficiente y estable al ser empleada en la reacción de etanolisis.

#### ▪ Empleo de Lipozyme TL

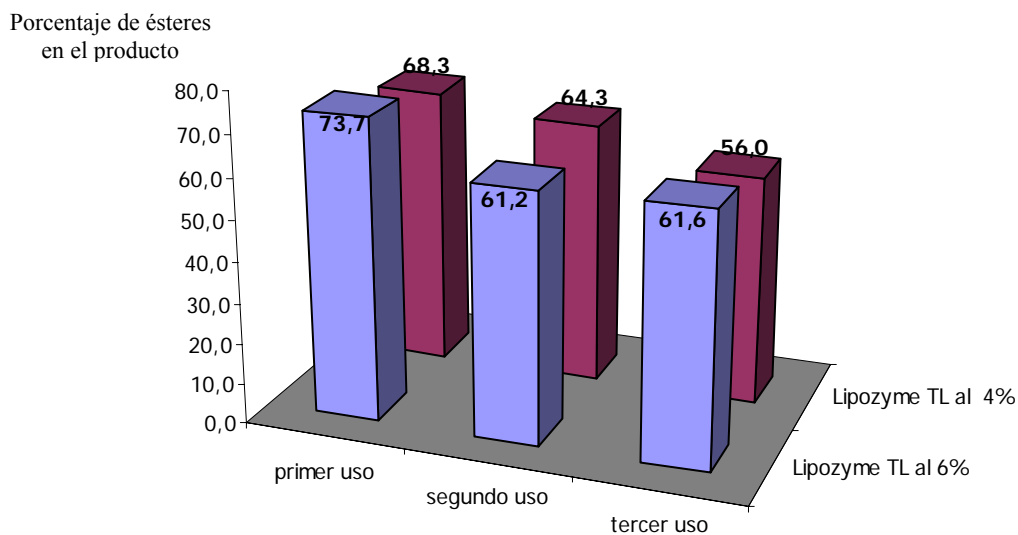
Como el porcentaje de ésteres no superó el 67% en reusos sucesivos de Lipozyme IM se decidió de manera exploratoria emplear la lipasa inmovilizada Lipozyme TL de la misma casa productora que Lipozyme IM y con especificidad 1,3.

Al emplear Lipozyme TL sin adicionar gel de sílice los resultados fueron muy similares a los obtenidos con Lipozyme IM, al parecer el problema de inactivación es común en la reacción

de alcoholisis para ambas preparaciones lipasas sin emplear un agente protector. Resultados similares se encontraron anteriormente en la metanolisis del aceite de soya, donde observó que el glicerol presenta efectos negativos en la actividad de Lipozyme TL. Para evitar tal efecto se utilizaron alcoholes como propanol, isopropanol, butanol y t-butanol que eliminan el glicerol al lavar la enzima inmovilizada [19].

Al utilizar sucesivamente Lipozyme TL adicionando *silica gel* al medio, se consiguieron resultados satisfactorios: el rendimiento de ésteres decae un 15% después del tercer uso y aparentemente se mantiene. Se comparó la producción de ETE's usando Lipozyme TL al 4% y 6% (Figura 34), donde se observa una variación muy leve, siendo posible emplear una menor cantidad de enzima consiguiendo iguales resultados. Al parecer el soporte de la lipasa juega un papel importante cuando se utilizan bajas condiciones de hidratación y reactivos hidrófilos polares como el alcohol etílico.

Figura 34. Estabilidad de Lipozyme TL con adición de *silica gel* (condiciones COF)



La Tabla 15 presenta los rendimientos encontrados al utilizar Lipozyme IM y TL en comparación con otros trabajos reportados donde se utiliza *silica gel* y se observa su efecto protector en reacciones sucesivas a condiciones relativamente semejantes. Lipozyme TL se

comporta de una manera más adecuada que Lipozyme IM, manteniendo su estabilidad en varios usos, siendo posible su reutilización a escala preparativa para la obtención de ETE's.

Tabla 15. Ésteres obtenidos en reusos de Lipozyme IM a diferentes condiciones

REFERENCIA	USOS	% ÉSTERES EN EL PRODUCTO	
		Sin <i>Silica Gel</i>	Con <i>Silica Gel</i>
Lipozyme IM <sup>a</sup>	1	62	67
	2	34	54
	3	28	35
Lipozyme TL <sup>b</sup>	1	67	73
	2	22	61
	3	-	62
Selmi y col., 1998 <sup>c</sup>	1	83	83
	2	21	78
	3	7	50

<sup>a</sup> Se adicionó 20% de sílica gel en cada uso (con respecto al peso de aceite)

<sup>b</sup> Reacción con 6% de enzima y 20% de sílica gel

<sup>c</sup> SELMI, B and THOMAS, D. Immobilized lipase catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. *En: J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol. 75, No. 6 (1998); p. 691-695. Etanol absoluto, aceite de girasol, Lipozyme IM, 50°C, 5 h., rel. molar 1:3, 0% de agua y 10% de sílica

En resumen, producciones del 66% de ésteres etílicos se obtienen en la etanólisis de aceite de palmiste en un medio compuesto solo de sustratos y catalizada por una lipasa inmobilizada específica como Lipozyme IM. Cantidades estequiométricas de sustratos son necesarias y una mejor etanólisis del PKO es lograda en un sistema libre de solvente. Es crucial el papel que juega la producción de glicerol y su efecto nocivo sobre la enzima. La adición de *silica gel* mejora significativamente la producción de ésteres etílicos utilizando la misma cantidad de enzima en diferentes usos. Para aumentar la conversión del PKO sería adecuado emplear una enzima cuyo soporte no tenga afinidad por compuestos polares.

#### 4. CONCLUSIONES

- Empleando un proceso enzimático con el uso de Lipozyme IM y Lipozyme TL es posible la obtención de ésteres grasos a partir del aceite de palmiste, con mínima producción de desechos contaminantes, empleando reactivos seguros en su manejo y en un proceso con adecuados rendimientos.
- En reacciones a escala laboratorio y preparativa es posible emplear Lipozyme IM para obtener ésteres etílicos en un porcentaje de 71% y 62% respectivamente, en un solo *Batch*, sin necesidad del uso de solventes o agua adicional en el sistema.
- Lipozyme IM disminuye considerablemente su actividad catalítica luego del primer uso en un medio sin y con agentes protectores (*silica gel*), haciendo poco viable su reuso prolongado, tanto en escala laboratorio como preparativa.
- Lipozyme TL mantiene su actividad catalítica hasta un tercer uso sucesivo a escala preparativa siempre y cuando se adicione al medio de reacción un agente protector como la *silica gel*.
- Al trabajar con Lipozyme IM y TL en ningún caso es necesario la adición de agua al medio de reacción, siendo suficiente la que presenta la enzima en su estado original, siempre y cuando los reactivos empleados sean anhidros.
- La reacción de etanolisis a condiciones COF produce cantidades de mono y di acilgliceroles, de 15% para Lipozyme IM y 22% para Lipozyme TL, siendo subproductos que luego de ser separados y purificados pueden ser utilizados en diversas áreas de la oleoquímica (ej. emulsificantes).

## 5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de Lipozyme TL en las reacciones de etanolisis del aceite de palmiste siempre y cuando sea agregado al medio de reacción un agente protector que adsorba el glicerol formado.
- Lipozyme IM y TL son enzimas inmovilizadas que pueden ser empleadas en otros tipos de reacciones además de la alcoholisis, por tanto se recomienda su estudio y aplicación con otros sustratos de diferente naturaleza, por ejemplo en la obtención de poliésteres de sacarosa por vía enzimática.
- Para tener en cuenta el uso de metanol en la alcoholisis se podría considerar la posibilidad de adición por etapas, evitando así su fuerte efecto inactivante.
- Es necesario estudiar la reacción de alcoholisis empleando un sistema continuo debido a que el comportamiento de las variables puede ser diferente que en un sistema por lotes.

## BIBLIOGRAFIA

1. ABIGOR, R. et al. Lipase catalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. En: Biochemical Society Transactions. Vol. 28, No. 6 (2000); p. 979-981
2. AICHHOLZ, R. and LORBEER, E. Separation of triacylglycerols by high temperature gas chromatography on seven different stationary phases. En: J. High Res. Chromatogr. Vol. 21, (1998); p. 363-367
3. AKOH, C. Fat replacers. En: Food Technology. Vol. 52 (1998); p. 47-53.
4. ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. En: Ars Pharmaceutica. Vol. 39, No. 2 (1998); p. 23-39
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Estados Unidos. 5 ed. 1990
6. BADUI, S. Química de los alimentos. 3 ed. México: Alambra, 1996. p. 648
7. BASIRON, Y. y AMIRUDDIN, M. Comercialización y aspectos económicos del aceite del palmiste. En: Palmas. Vol. 16, (1995); p. 65-69
8. BLOOMER, S. and ADLERCREUTZ, P. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 14 (1992); p. 546-552
9. BOOCOCK, G.B. et al. Fast formation of high purity methyl esters from vegetable oils. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 75, No. 9 (1998); p. 1167-1172
10. BOX, G. y HUNTER, W. Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona: Reverte, 1993. p. 675

11. BOYLE, E. Monoglycerides in food systems : current and future uses. En: Food Technology. Vol. 51, No. 8 (1997); p. 52-59
12. CHIBATA, I. Immobilized Enzymes. Research And Development. Tokyo: Holdsted Press, 1978. p. 284
13. CHO, S. and RHEE, J. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 41, No. 2 (1993); p. 204-210
14. CLARK, J. Catalysis for green chemistry. En: Pure Apply. Chem. Vol. 73, No. 1 (2001); p. 103-1117
15. DE FILIPPIS, P. and GIAVARINI, C. Transesterification processes for vegetable oils: a simple control method of methyl ester content. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 72, No. 11 (1995); p. 399-440
16. DEL RIO, J. and CAMINAL, G. Lipase catalyzed synthesis of natural ethanol esters: effect of water removal on enzyme reutilization. En: J. Chem. Technol. Biotechnol. Vol. 75 (2000); p. 991-996
17. DOSSAT, V. et al. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. En: Enzyme and microbial technology. Vol. 25 (1999); p. 194-200
18. DOSSAT, V. et al. Lipase catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 30 (2002); p. 90-94
19. DU, W; XU, Y. and LIU, D. Lipase catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. En: Biotechnol. Apply. Biochem. Vol. 38 (2003); p. 103-106

20. DUDAL, Y. and LORTIE, R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. En: Biotechnol. and Bioeng. Vol. 45 (1995); p. 129-134
21. ENCINAR, J. et al. Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* oils with ethanol. En: Energy and Fuels. (2001)
22. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Clean fuels : An Overview. 1994. Office Of Mobile Sources. Fact Sheet OMS-6
23. ERGAN, F. and TRANI, M. Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. En: Biotechnology Letters. Vol. 13, No. 1 (1991); p. 19-24
24. ERGAN, F. et al. Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipases in non-aqueous media. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 35 (1990); p. 195-200
25. EVANS S, R. Notas taxonómicas, etnobotánicas y de nomenclatura sobre la *Elaeis*. En: Palmas. Vol. 12, No. 3 (1991)
26. FEDEPALMA: Estadísticas [on line]. Bogotá, Colombia [2003]. Disponible en internet: <http://www.fedepalma.org>.
27. FOGLIA, T. and JONES, K. Technologies supporting the adoption of biodiesel as an alternative fuel. En: The cotton gin and oil mill press. (2000)
28. GANDHI, N. Applications of lipase. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 74, No. 6 (1997); p. 621-634
29. GANDHI, N. Lipozyme deactivation by butanol and temperature. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 17, No. 4 (1995); p. 373-380

30. GANDHI, N. et al. Lipase catalyzed esterification. En: Catal. Rev. Sci. Eng. Vol. 42, No. 4 (2000); p. 439-480
31. GANDHI, N. et al. Studies on the Lipozyme catalyzed synthesis of butyl laurate. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 46, No. 1 (1995); p. 1-12
32. GARCÉS, I. y CUELLAR, M. Productos derivados de la industria de aceite de palma. Usos. En: Palmas. Vol. 18, No. 1 (1997); p. 33-47
33. GHAZALI, H. and HAMIDAH, S. Enzymatic Transesterification of Palm Olein with Nonspecific and 1,3-Specific Lipases. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 72, No. 6 (1995); p. 633-639
34. GIESE, J. Fats, oils and fat replacers. 1996. En: Food Technology. (78-83)
35. GOMA-DONCESCU, N. and LEGOY, M. An original transesterification route for fatty acid ester production from vegetable oils in a solvent - free system. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 74, No. 9 (1997); p. 1137-1143
36. GOMES, F. and PEREIRA, E. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. En: Biomacromolecules. Vol. 5 (2004); p. 17-23
37. GORMAN, L. and DORDICK, J. Organic solvents strip water off enzymes. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 39, (1992); p. 392-397
38. GRABOSKI, M. and MC CORMICK, R. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. En: Prog. Energy Combust. Sci. Vol. 24 (1998); p. 125-164
39. GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. En: OCL. Vol. 6, No. 5 (1999); p. 365-372
40. HSU, A. et al. Immobilized lipase catalyzed production of alkyl ester of restaurant grease as biodiesel. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 36 (2002); p. 181-186

41. HSU, A. et al. Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 78, No. 6 (2001); p. 585-588
42. HULT, K and BERGLUND, P. Engineered enzymes for improved organic synthesis. En: Current opinion in Biotechnology. Vol. 14 (2003); p. 1-6
43. IRAZOQUI, H y ISLA M. Oportunidades de investigación y desarrollo en el área de la oleoquímica a partir de aceites vegetales: producción de moléculas precursoras. En: Aceites y Grasas. (Jun. 1996); p. 192-198
44. ISMAIL, Z and AHMAD, S. Palm based anionic surfactants. En: PORIM information series. Vol. 48 (1997)
45. ISO, M et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 16 (2001); p. 53-58
46. JANSSEN, A. and SJURSNES, B. Kinetics of lipase catalyzed esterification in organic media : correct model and solvent effects on parameters. En: Enzyme Microb. Technol. Vol. 24 (1999); p. 463-470
47. JASPER, J. GC-FID and acyl carbon number-based determination of characteristic groupings of complex triglyceride (Benefat S and other mixtures). En: J. Agric. Food Chem. Vol. 48 (2000); p. 785-791
48. KAUFMAN, J. y RUEBUSCH, R. Oleoquímicos, tendencias mundiales. En: Palmas. Vol. 12, No. 3 (1991); p. 61-70
49. KENNEDY, J. Structured Lipids : Fats of the Future. En: Food Technology. (1991); p. 76-83

50. KUSDIANA, D and SAKA, S. Biodiesel fuel for diesel fuel substitute prepared by a catalyst free supercritical metanol. e- <http://www.energy.kyoto-u.ac.jp>
51. LECHNER, M. and BAUER-PLANK, C. Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by on line normal phase LC-GC. 1997. En: J. High Res. Chromatogr. Vol. 20 (581-585)
52. LEE, CH. and PARKIN, K. Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 75, No. 2 (2001); p. 219-227
53. MA, F. et al. Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow. En: Ind. End. Chem. Res. Vol. 37 (1998); p. 3768-3771
54. MACEDO, G. and PASTORE, G. Lipase catalyzed synthesis of isoamyl acetate in free solvent media optimization using a central composite design. En: Food, agriculture and environment. Vol. 1 (2003); p. 3-4
55. MAZZANI, B. Plantas oleaginosas. Barcelona: Salvat, 1963. p. 433
56. MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils : Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils. En: Chromatographia. Vol. 37, No. 11-12 (1993); p. 623-626
57. MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 67, No. 3 (1990); p. 168-170
58. MOE, O. and CORNELIUS, R. Enzyme kinetics. En: J. Chem. Edu. Vol. 65, No. 2 (1988); p. 137-141
59. MONTGOMERY, D. y RUNGER, G. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. México: McGraw Hill, 1996. p. 1094

60. MORENO, N. Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma. Bucaramanga, 2001, 109 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
61. MURPHY, D. Lípidos vegetales. Desarrollo de nuevos cultivos en el siglo XXI. En: Aceites y grasas. (Dic. 2000); p. 551-556
62. NELSON, L. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 73, No. 8 (1996); p. 1191-1195
63. NOUREDDINI, H. and HARMEIER, S. Enzymatic glycerolysis of soybean oil. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 75, No. 10 (1998); p. 1359-1365
64. NOUREDDINI, H. and ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 74, No. 11 (1997); p. 1457-1463
65. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Biotechnology for Clean Industrial Products and Processes. Towards Industrial Sustainability. Francia, 1998
66. OTERA, J. Transesterification. En: Chemical Reviews. Vol. 93, No. 4 (1993); p. 1449-1470
67. PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 29 (1999); p. 119-131
68. PANTZARIS, T and AHMAD, M. Techno-economic aspects of palm kernel oil. En: INFORM. Vol. 12 (2001); p. 69-80
69. PANTZARIS, T. and AHMAD, M. Properties and utilization of palm kernel oil. En: Malaysian Palm Oil Board MPOB, (2000). p. 11-23

70. PARK, J and LEE, D. Detection of adulteration in olive oils using triacylglycerols compositions by high temperature gas chromatography. En: Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 24, No. 4 (2003); p. 527-530
71. PECNIK, S and KNEZ, Z. Enzymatic fatty ester synthesis. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 69, No. 3 (1992)
72. PERONA, J y RUÍZ-GUTIÉRREZ, V. La cromatografía líquida de alta eficiencia en la separación de triglicéridos de grasas animales complejas. En: Grasas y Aceites. Vol. 50, No. 4 (1999); p. 298-311
73. PLANK, C and LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol and mono, di and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. En: Journal of Chromatography A. Vol. 697 (1995); p. 461-468
74. POLAT, T and LINHARDT, R. Syntheses and applications of sucrose based esters. En: Journal of Surfactants and Detergents. Vol. 4, No. 4 (2001); p. 415-421
75. QUINLAN, P and MOORE, S. Modification of triglycerides by lipases : process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. En: INFORM. Vol. 4, No. 5 (1993); p. 580-585
76. ROCHA, J. et al. Optimization of the enzymatic synthesis of n-octyl oleate with immobilized lipase in absence of solvents. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Vol. 74 (1999); p. 607-612
77. SÁNCHEZ, A y VALERO, F. Diseño de experimentos en el escalado de biorreactores enzimáticos. En: Industria Farmacéutica. (ene. – feb. 2000); p. 105-109
78. SCHUCHARDT, U and SERCHELI, R. Transesterification of vegetable oils: a review. En: J. Braz.Chem. Soc. Vol. 9, No. 1 (1998); p. 199-210

79. SELMI, B and THOMAS, D. Immobilized lipase catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 75, No. 6 (1998); p. 691-695
80. SELMI, B. et al. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent free medium. En: Enzyme Microb. Technol. Vol. 23 (1998); p. 182-186
81. SHAW, J and WANG, D. Lipase catalyzed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long chain fatty acids. En: Enzyme Microb. Technol. Vol. 13 (1991); p. 544-546
82. SHIMADA, Y. et al. Conversión of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida Antarctica* lipase. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 76, No. 7 (1999); p. 789-793
83. SILVA, J and JESUS, P. Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on Chrysotile for esterification. En: An acad. Bras. Cienc. Vol. 75, No. 2 (2003); p. 157-162
84. SRIVASTAVA, A and PRASAD, R. Triglyceride-based diesel fuels. En: Renewable and sustainable Energy Reviews. Vol. 4 (2000); p. 111-133
85. STEVENSON, D. et al. Near quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 16 (1994); p. 478-484
86. THIN, T. Calidad actual del palmiste y del aceite de palmiste. En: Palmas. Vol. 13, No. 4 (1992)
87. TREVAN, M. Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology. John Wiley, 1980. p. 138
88. TUNDO, P. et al. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. En: Pure Appl. Chem. Vol.72, No. 7 (2000); p. 1207-1228

89. TURNER, N. and VULFSON, E. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 27, No. 1-2 (2000); p. 108-113
90. UOSUKAINEN, E. and LAMSA, M. Optimization of enzymatic transesterification of rapeseed oil ester using response surface and principal component methodology. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 25 (1999); p. 236-243
91. VALENZUELA, A. and NIETO, S. Biotechnology of lipids : the use of lipases for the structural modifications of fats and oils. En: Grasas y Aceites. Vol. 45, No. 5 (1994); p. 337-343
92. VALIVETY, R. et al. *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. En: FEBS letters. Vol.3 (1992); p. 258-260
93. VICENTE, G. et al. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. En: Industrial Crops and Products. Vol. 8 (1998); p. 29-35
94. VICENTE, G. et al. Biodiesel: una alternativa real al gasóleo mineral. En: Ingeniería Química. (mar. 2001); p. 135-145
95. VICENTE, G; MARTINEZ, M. and ARACIL, J. Ésteres metílicos de girasol como combustibles. En: Ingeniería Química. (mar. 1999); p. 153-159
96. VILLENEUVE, P. and FOGLIA, T. Lipase specificities. Potencial application in lipid bioconversions. En: INFORM. Vol. 8, No. 6 (1997); p. 640-650
97. WATANABE, Y. et al. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida Antarctica* lipase. En: J. Am. Oil Chem. Vol. 77, No.4 (2000); p. 355-360
98. WATANABE, Y. et al. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed bed bioreactor. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 78, No. 7 (2001); p. 703-707

99. WOODWARD, J. Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach. Oxford, : IRL PRESS, 1985. p. 177
100. WU, W. et al. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 76, No. 4 (1999); p. 517-521
101. YAHYA, A. R. et al. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. En: Enzyme and Microb. Technol. Vol. 23 (1998); p. 438-450
102. YOUNG, F. Palm kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses. En: J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 60, No. 2 (1983); p. 374-379
103. YUEN, CH. and AH NGAN, M. Palm oil methyl esters as fuel: Palm diesel. En: PORIM information series. Vol. 17 (1993)
104. ZAKS, A. and KLIBANOV, A. The effect of water on enzyme action in organic media. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 263, No. 17 (1988); p. 8017-8021
105. ZILLER, S. Grasas y aceites alimentarios. Acribia, 1994